



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**



**Mémoire de fin d'études  
en vue de l'obtention du diplôme de docteur veterinaire**

**THEME :**

**LES ANTIBIOTIQUES EN MEDCINE VETERINAIRE**

**Présenté par :**  
**Encadre par :**

- ZITOUNI SAMIR
- ZOUARI MOHAMED AMINE

Mme GHAZI .KH

**Année universitaire : 2018 – 2019**

## **Remerciements**

**Je remercie ALLAH qui m'aide et me donne la patience, la volonté, le courage et la santé durant ces**

**longues années d'étude.**

**J'exprime également ma gratitude à mon encadreure madame GHAZI .KH de m'avoir proposé ce**

**sujet de recherche, s'est toujours montrer à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire.**

**Et en fin j'adresse mes s'incère remerciements a mes**

**parents, mes frères, ma sœur, et a toutes mes amies.**

*dédicace*

A nos chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour,  
leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes  
études,

A nos chers frères, pour leur appui et leur encouragement,  
A toute la famille ZOUARI et ZITOUNI pour leur soutien  
tout au long de notre parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant  
allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour nous.

## Sommaire

<b>1.Définitions</b> .....	1
<b>2.Découverte des antibiotiques</b> .....	2
<b>3.Classification des antibiotiques</b> .....	4
<b>3.1Critères de classification</b> .....	4
<b>4.Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des antibiotiques</b>	13
<b>4.1Propriétés pharmacodynamiques</b> .....	14
• La CMI.....	15
Définition: .....	15
• Détermination de la CMI : .....	16
I. Méthode de dilution en milieu liquide.....	16
II. Méthode de dilution en milieu gélosé.....	17
• La CMB .....	18
Définition: .....	18
• Détermination de la CMB :.....	18
I. Type de relation dose-effet .....	19
a)Relation concentration-intensité de l'effet bactéricide :.....	19
II. Effet post-antibiotique (EPA) et effet sub-inhibiteur .....	20
<b>4.2Propriétés pharmacocinétiques</b> .....	20
<b>5.Association d'antibiotiques</b> .....	25
<b>5.1Règles d'associations d'antibiotiques</b> .....	25
<b>5.2Conséquences d'association d'antibiotiques</b> .....	26
I. <b>Définitions de la résistance bactérienne aux antibiotiques</b> .....	37
1. Rappels de pharmacologie .....	37
<b>1.1. Pharmacocinétique</b> .....	37
<b>1.2. Pharmacodynamie</b> .....	40
<b>1.3. Approche pharmacocinetique-pharmacodynamique pk/pd</b> .....	45

2. Les mécanismes microbiologiques de la résistance.....	47
2.1. Définitions de la résistance .....	47
2.2. Mécanismes bactériens de la résistance .....	50
3. Ecologie microbienne.....	52
<b>3.1. Fenêtre de sélection .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2. Compartiment de sélection.....</b>	<b>53</b>
4. Mesure de la résistance .....	56
<b>4.1. Méthodologie de l'antibiogramme.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Méthodologie moléculaire .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3. Méthodologie épidémiologique .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4. Les indicateurs de la résistance.....</b>	<b>66</b>
<b>III. Analyse de l'impact de l'usage des antibiotiques sur la résistance bactérienne chez l'animal.....</b>	<b>68</b>
1. Etude de l'émergence de la résistance .....	68
2. Etude de la sélection et de la diffusion de la résistance.....	69
<b>2.1. Etude de l'impact sur les bactéries responsables de zoonose .....</b>	<b>70</b>
<b>2.2. Etude de l'impact sur les bactéries de la flore commensale intestinale</b>	<b>74</b>
<b>2.3. Etude de l'impact sur les bactéries pathogènes vétérinaires .....</b>	<b>82</b>
3. Effet d'un arrêt de l'usage d'un antibiotique .....	83
4. Limites et perspectives des travaux épidémiologiques.....	86
<b>4.1. Biais de sélection.....</b>	<b>86</b>
<b>4.2. Biais de classement.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3. Biais de confusion .....</b>	<b>89</b>
<b>4.4. Valeur quant à l'inférence biologique.....</b>	<b>90</b>
5. Conséquences indésirables.....	93
<b>5.1. Santé animale.....</b>	<b>93</b>
<b>5.2. Consommation d'antibiotiques.....</b>	<b>94</b>
<b>5.3. Influence sur les plasmides de résistance aux antibiotiques .....</b>	<b>95</b>

# INTRODUCTION

Les anti-infectieux occupent une place importante en médecine vétérinaire. L'importance des antibiotiques et des antibactériens est considérable en médecine en raison de leur efficacité pour combattre les infections bactériennes animales, associée en général à une faible toxicité (**Merck,2008**).

Les antibiotiques sont des substances chimiques originellement produites par des microorganismes. De nos jours, ils sont aussi obtenus par synthèse ou semi-synthèse. A faible concentration, ces molécules peuvent inhiber la croissance, voire même détruire, des bactéries (**Merck,2008**).

Leur importance est capitale dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ces molécules sont employées dans de nombreux domaines comme principal moyen de lutte contre les infections bactériennes. Elles sont utilisées en médecine humaine mais également en médecine vétérinaire, que ce soit dans les élevages d'animaux de production ou pour soigner les animaux de compagnie. Et sont la seconde classe de médicaments utilisés en médecine vétérinaire. Ils représentent environ 20% du volume des produits pharmaceutiques vétérinaires utilisé (**Toutain, 2007**).

# CHAPITRE I

## **GENERALITES SUR LES ANTIBIOTIQUES**



L'avènement des anti-infectieux en médecine vétérinaire et humaine a complètement révolutionné le domaine médical et entraîné une réduction importante de la mortalité associée aux infections, il a par ailleurs contribué au développement de l'élevage, notamment l'élevage intensif.

Ces anti-infectieux sont classés en deux catégories :

- Des composés d'origine naturelle produits par des organismes : les antibiotiques.
- Des composés artificiels : les antibactériens de synthèse ou antimimétiques.

### **1.Définitions**

On distingue plusieurs définitions des antibiotiques.

Un antibiotique est un dérivé produit par le métabolisme de micro-organismes possédant une activité anti-bactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte. Cette notion a été étendue aux molécules obtenues par hémisynthèse(**Jacques ,1999**).

De manière simplifiée un antibiotique est dans le domaine médical, « une substance chimique organique d'origine naturelle ou synthétique inhibant ou tuant les bactéries pathogènes à faible concentration et possédant une toxicité sélective ». Par toxicité sélective, on entend que celle-ci est spécifique des bactéries et que la molécule antibiotique n'affecte pas l'hôte infecté, au moins aux doses utilisées pour le traitement.

Plus généralement, pour les microbiologistes et les chimistes , un antibiotique est une substance anti-bactérienne (**Ronald,2003**).

Il a existé des variantes dans cette définition qui diffèrent par la présence ou non des concepts de toxicité sélective, d'origine microbienne et de limitation de cible aux seules bactéries. Les antiseptiques ne sont pas des antibiotiques. Leur fonction est de tuer un maximum de germes (bactéries, champignons, virus), leur mode d'action n'est pas spécifique, ils ne s'utilisent que localement en application externe et mal employés (trop concentrés par exemple) ils peuvent provoquer des lésions et/ou retarder la cicatrisation.

Les antibiotiques ne sont généralement pas actifs contre les virus. Un produit luttant contre les virus est un antiviral. Toutefois, des études en cours tendent à

démontrer une certaine efficacité de quelques antibiotiques dans des cas particuliers (**Wang,2016**).

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle, produites par des micro-organismes, qui à très faible concentration, ont le pouvoir d'inhiber la croissance, voire de détruire des bactéries ou d'autres microorganismes (**Waksman,1944**).

## **2.Découverte des antibiotiques**

Le premier antibiotique identifié fut la pénicilline, Si dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle Ernest Duchesne découvrit les propriétés curatives de *Penicillium glaucum*, ladécouverte de lapénicilline est à mettre au crédit de Sir Alexander Fleming qui s'aperçut en 1928 que certaines de ses cultures bactériennes dans desboîtesoubliées avaient été contaminées par les expériences de son voisin de paillestudiant le champignon*Penicillium notatum* et que celui-ci inhibait leur reproduction. Mais l'importance de cette découverte, ses implications et ses utilisations médicales ne furent comprises et élaborées qu'après sa redécouverte, entre les deux grandes guerres notamment suite aux travaux de Howard Walter Florey, Ernst Chain, et Norman Heatley en 1939.

En 1932, Gerhard Domagk met au point chez Bayer AG le Prontosil, un sulfamidé, le premier antibiotique de synthèse. C'est toutefois la découverte subséquente, à l'Institut Pasteur, dans le laboratoire de chimie thérapeutique dirigé par Ernest Fourneau, des propriétés antibiotiques du sulfanilamide, agent actif du Prontosil, (découverte publiée en 1935 par Jacques et Thérèse Tréfouel, Federico Nitti et Daniel Bovet) qui ouvrira effectivement la voie à la sulfamidothérapie (**Heather,2006**).

Ce premier antibiotique de synthèse a ouvert une voie nouvelle dans la lutte contre de nombreuses maladies qui étaient considérées comme incurables auparavant.

En 1944, Selman A. Waksman, Albert Schatz et E. Bugie découvrent la streptomycine, le premier antibiotique ayant un effet sur le bacille de Koch, rendant ainsi possible le traitement de la tuberculose. En 1952, commercialisation sous la marque Ilosone de l'érythromycine, premier macrolide connu, nouvellement isolée par J. M. McGuire, de la firme Eli Lilly. En 1956 est découverte la vancomycine. Suivent alors le développement des quinolones à partir de 1962 et leurs dérivés, les fluoroquinolones dans les années 1980 (**Mcdermott et Rogers ,1982**).

découverte de quelques molécules figurent dans le tableau 1.

Micro-organisme	Famille	Molécule	Date de découverte
<i>Penicillium</i>	Pénicillines	Pénicilline	1929
<i>Streptomyces</i>	Aminoglycosides	Streptomycine	1944
		Néomycine	1949
		Kanamycine	1957
		Tobramycine	1967
		Amikacine	1975
	Tétracyclines	Chlortétracycline Oxytétracycline	1948 1949
	Quinolones	Acide nalidixique	1962
<i>Cephalosporum</i>	Phénicolés	Chloramphénicol	1946
	Macrolides	Erythromycine	1952
	Céphalosporines	Céphalotine	1954

**Tableau 1** : Découverte de quelques molécules antibiotiques (Maillard,2002)

Les antibiotiques peuvent donc être d'origine naturelle, semi-synthétique ou produits en totalité par synthèse chimique. Actuellement, les principaux composés antibactériens employés en médecine vétérinaire sont issus de bactéries actinomycétales du genre *Streptomyces*, de champignons ou de bacilles. Les composés les plus récents ont été produits par semi-synthèse et par synthèse (**Enriquez,2002**).

### **3.Classification des antibiotiques**

Actuellement, il existe un nombre très important d'antibiotiques. Il est plus facile pour le praticien, en vue d'une prescription, d'avoir un classement rigoureux des molécules existantes.

Une famille d'antibiotiques regroupe des composés dont les structures chimiques sont proches. Les modes d'action, ainsi que les spectres d'action, sont aussi semblables. Cette famille pourra ensuite être subdivisée en groupes et en sous-groupes. Cependant, il faut noter qu'il existe des antibiotiques orphelins, n'appartenant à aucune famille tels que l'acide fusidique, la fosfomycine (**Enriquez,2002**).

#### **3.1Critères de classification**

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères :

- Leur origine : (bio-synthétisés par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*,artificiels).
- Leur structure chimique (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques).
- Le type de leur activité antibactérienne...etc. (**Enriquez,2002**).

##### **3.1.1Classification selon l'origine**

On distingue trois grands groupes d'antibiotiques :

- Les antibiotiques naturels, élaborés par les micro-organismes :
- Des champignons inférieurs : *Penicillium*, *Cephalosporium*.

- Des bactéries : Bacillus et surtout Streptomyces (90% des antibiotiques sont produits par des Streptomyces).
- Les antibiotiques hémisynthétiques ou de ½ synthèse : ils résultent de la transformation chimique des composés naturels.
- Les antibiotiques artificiels : obtenus par synthèse chimique. **(Enriquez,2002).**

### **3.1.2 Classification en familles d'antibiotiques**

Cette classification est la plus utilisée car fondée sur la structure chimique de base d'un chef de file, premier d'une série elle regroupe « en familles » ou « classes » des produits ayant des caractéristiques communes : de structure, de spectre d'activité, de cible moléculaire bactérienne de sensibilité à des mécanismes de résistance (résistances croisées) et d'indications cliniques. **(Enriquez,2002).**

Les principales familles d'antibiotiques sont présentées dans le Tableau 2.

Famille	Sous-famille	Origine	Molécule(s)
Bêta-Lactamines	Pénicillines	Naturelle	Pénicilline G
		Semi-Synthétique	Oxacilline et Cloxacilline (groupe M)
			Ampicilline et amoxicilline (groupe A)
	Céphalosporines	Naturelle ou Semi-synthétique	Céfalogtine, Cefalexine (1 <sup>ère</sup> génération)
			Céfalonium (2 <sup>ème</sup> génération)
			Céfopérazone, Ceftiofur (3 <sup>ème</sup> génération)
			Cefquinome (4 <sup>ème</sup> génération)
	Polypeptides		Naturelle
Bacitracine			
Aminosides		Naturelle ou semi-synthétique	Streptomycine, kanamycine, apramycine, gentamicine, éomycine...
			Spectinomycine
Macrolides		Naturelle ou semi-synthétique	Erythromycine, spiramycine, tylosine, Tilmicosine
Tétracyclines		Naturelle ou semi-Synthétique	Oxytétracycline, chlortétracycline
Phénicolés		Semi-synthétique	Florfénicol
Apparentés aux Macrolides	Lincosamides	Naturelle	Lincomycine, clindamycine
Sulfamides		Synthétique	Sulfaguanidine, sulfadimidine, sulfadiméthoxine...
Quinolones		Synthétique	Acides nalidixique et oxolinique (1 <sup>ère</sup> génération)
			Fluméquine (2 <sup>ème</sup> génération)
			Enro-, dano-, marbo-, difloxacin (3 <sup>ème</sup> génération)

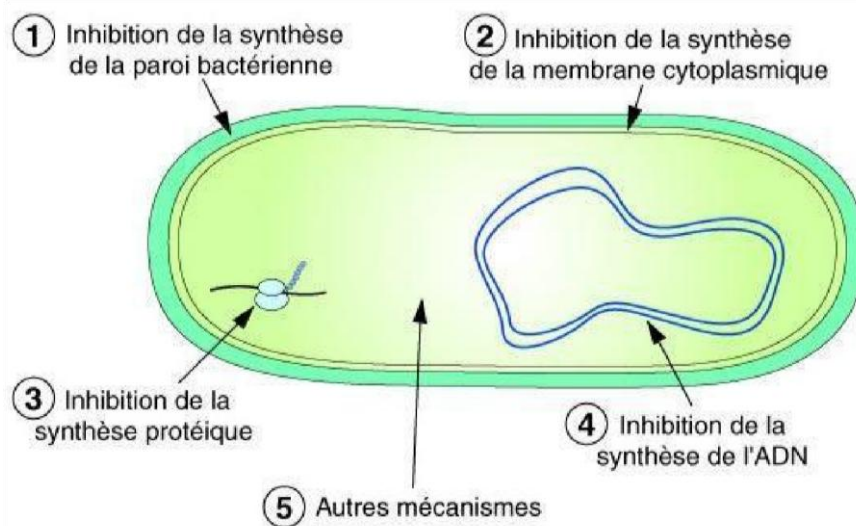
Tableau 2 : Principales familles d'antibiotiques. (Enriquez et al ,2002).

### 3.1.3 Classification selon le mécanisme d'action des antibiotiques

Les différentes classes d'antibiotiques ont des mécanismes d'action différents et le plus souvent plusieurs effets sur une bactérie.

Les cibles d'action des antibiotiques sont variées : ribosomes, paroi bactérienne, topoisomérases, etc. avec comme conséquences l'inhibition de la synthèse protéique, l'inhibition de la synthèse de la paroi, l'altération de la structure de acides nucléiques. Ces mécanismes d'action font entrer en jeu des interactions entre antibiotique et cible d'action. L'action de l'antibiotique sur une espèce bactérienne dépend donc de la présence de la cible au sein de la cellule bactérienne ou de la capacité d'accès à cette cible (**Maillard, 2002**).

Les figures 1 résume les principaux sites d'action des antibiotiques



**Figure 1 :**Principaux sites d'action des antibiotiques (**Maillard, 2002**).

Les antibiotiques actuels peuvent se diviser en 5 groupes, en fonction de leur cible pharmacologique.

### **3.1.3.1 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi**

#### **bactérienne Dans cette catégorie, nous trouvons :**

- les  $\beta$ -lactamines, qui inhibent la transpeptidase intervenant dans la synthèse de la paroi; ils sont actives que sur les bactéries en croissance qui synthétisent du peptidoglycane.
- les glycopeptides (vancomycine, ristocétine et teicoplanine) qui se lient à un intermédiaire de synthèse.
- Aucune cible n'est atteinte chez les bactéries à Gram négatif car ces antibiotiques ne peuvent pas traverser la membrane externe. Ceci explique que les glycopeptides ont un spectre étroit limité aux bactéries à Gram positif (principalement streptocoques, entérocoques et staphylocoques). Chez les bactéries à Gram positif, ces antibiotiques diffusent librement à travers les mailles du peptidoglycane. En revanche, ils ne peuvent traverser la membrane cytoplasmique et leur action s'exerce sur la paroi en formation.
- La bacitracine est active uniquement sur les bactéries à Gram positif (la membrane externe des bactéries à Gram négatif est imperméable à cette molécule). (Kaplan, 1998)

### **3.1.3.2 Antibiotiques inhibiteurs de la membrane cytoplasmique**

En raison de la similitude entre les membranes des cellules bactériennes et des cellules eucaryotes, les antibiotiques actifs sur la membrane sont toxiques et seul un nombre restreint de molécules a trouvé une utilisation thérapeutique.

Les polymyxines : polymyxine B et polymyxine E (colistine) sont constituées d'un polypeptide cyclique et d'un acide gras. Par leur extrémité hydrophobe, ces antibiotiques pénètrent à l'intérieur de la membrane et s'incorporent à la couche lipidique alors que l'extrémité hydrophile reste orientée vers l'extérieur. Il en résulte une désorganisation de la structure membranaire ce qui provoque la mort de la cellule.

Les polymyxines actives sur les bactéries à Gram négatif, agissent tout d'abord sur la membrane externe entraînant des modifications morphologiques comme la



formation de vésicules, puis la membrane cytoplasmique est atteinte ce qui provoque la fuite de substances intracellulaires et la mort des bactéries( Walters,1993).

### **3.1.3.3 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines Ce sont les composés les plus nombreux.**

Les ribosomes procaryotes ne sont pas constitués des mêmes protéines que les ribosomes eucaryotes, et ont d'ailleurs des coefficients de sédimentation différents .

Il existe des inhibiteurs :

- de la sous-unité 50Svedberg, qui empêchent la fixation d'un nouvel acide aminé sur la chaîne en croissance (phénicolés) ou le transfert de la chaîne en croissance du site A vers le site P (macrolides, lincosamides, streptogramines).
- de la sous-unité 30 Svedberg, qui empêchent ou perturbent la liaison des aminoacylARNt aux ribosomes (tétracyclines,aminoglycosides) (Brosius,1978).

### **3.1.3.4Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs**

On distinguera les antibiotiques actifs d'une part sur la synthèse des ARN et d'autre part, sur la synthèse des ADN ou de leurs précurseurs.

- Les inhibiteurs de l'ARN polymérase sont représentés par la classe des ansamycines, tandis que les inhibiteurs des topoisomérases regroupent les quinolones.

Ces 2 familles d'antibiotiques doivent leur spécificité d'action aux différences qui existent entre les enzymes procaryotes et eucaryotes et qui permettent la reconnaissance spécifique d'un type de cible exclusivement .

- Les sulfamides agissent sur la synthèse de l'acide folique, un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques à incorporer dans les acides nucléiques. Leur spécificité d'action provient du fait que les eucaryotes ne synthétisent pas d'acide folique.

- Les diaminopyridines inhibent la réduction de l'acide folique en tirant parti de la différence de sensibilité de la dihydrofolate réductase bactérienne par comparaison avec l'enzyme des cellules eucaryotes (Damase,1998).

### **3.1.3.5 Antibiotiques inhibiteurs des voies métaboliques**

Chez les procaryotes, le métabolisme procède de voies très variées car ils ont acquis une capacité d'adaptation à la vie dans des milieux nutritifs et des conditions de survie très différents des eucaryotes. Malgré ce fait le nombre de molécules d'antibiotiques agissant à ce niveau et utilisables en clinique est très réduit (Baker,1998).

### **3.1.3.6 Antibiotiques anti-anaérobies**

Certaines bactéries sont capables de vivre en anaérobie en utilisant des voies d'oxydoréduction indépendantes de l'oxygène, et peuvent atteindre des niveaux de potentiel redox nettement plus bas que chez les eucaryotes. Ceci permet l'activation métabolique spécifique de certaines molécules, comme les nitroimidazoles, et leur confère un effet particulier sur ces organismes (et d'autres parasites anaérobies).

Les modes d'action sont très nombreux. Il est important de les connaître car ils permettent de comprendre les mécanismes de résistances naturelle et acquise des bactéries ( Baker,1998).

### **3.1.4 Classification des antibiotiques en fonction de leur spectre d'activité**

Le spectre d'activité d'un antibiotiques correspond à l'ensemble des espèces bactériennes qui lui sont sensibles. Lorsque le spectre d'activité est limité à un certain nombre d'espèces bactériennes, il est dit « étroit », tandis qu'un antibiotique actif sur de nombreuses bactéries est dit à spectre large. Enfin, une bactérie insensible à un antibiotique est définie comme étant résistante ( Maillard,2002).

Un antibiotique à spectre large agit sur un grand nombre de bactéries sur les bacilles et coques gram + et gram -.

Un antibiotique à spectre étroit agit seulement sur les bacilles et coques gram + ou gram -. ( Lafont,2002).

<p><b>Gram + et Cocci Gram -</b></p>	<p><b>Bacille Gram -</b></p>	<p><b>A large spectre</b></p>
<p>Pénicilline G Pénicillines  Anti-staphylococciques Cloxacilline  Méthicilline en association : avec ac.clavulanique Lincomycine Clindamycine Macrolides</p>	<p>Ampicilline Amoxycilline Aminoglycosides  Polypeptides Furanes Quinolones</p>	<p>Sulfamides / TMP Céphalosporines  (variable avec génération) Phénicolés Tétracyclines</p>

**Tableau 3 :** Classification des antibiotiques en fonction de leur spectre  
(Maillard et Lafont , 2002)

Le tableau 4 montre la variation du spectre d'activité de quelque antibiotique selon la nature de la paroi bactérienne :

Famille	Antibiotique	Gram+	Gram -
<b>β-lactamines</b>	Benzylpénicilline	+	-
	Oxacilline	+	-
	Ampicilline	+	+
	Imipénème	+	+
<b>Aminosides</b>	Gentamicine	+	+
	Tobramycine	+	+
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol	+	+
<b>Tétracyclines</b>	Doxycycline	+	+
<b>Macrolides</b>	Erythromycine	+	-
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	+	-
<b>Quinolones</b>	Acide nalidixique	-	+
<b>Autres</b>	Acide fucudique	+	-

**Tableau 4** : Spectre d'activité des antibiotiques selon la nature de la paroi bactérienne (Maillard et Lafont , 2002).

La distinction en antibiotiques à large spectre (céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération) et antibiotiques à spectre étroit (pénicilline G, glycopeptides) est ancienne.

Ce concept évolue au sein d'une famille d'antibiotiques en fonction de la mise au point de « nouveaux » dérivés (pénicilline G : spectre étroit ; aminopénicillines : spectre « élargi » vers les gram-négatifs) ; en fonction de la mise en évidence de « nouvelles » bactéries : exemple des macrolides, classés initialement à spectre étroit, reconnus aujourd'hui comme recouvrant : *Chlamydia* spp, *Bartonella* spp, *Helicobacter pylori*., témoignant ainsi d'un élargissement du spectre.( **Enriquez,2002**).

#### **4.Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des antibiotiques**

La connaissance à la fois de la pharmacodynamie et de la pharmacocinétique est essentielle afin de comprendre les effets des antibiotiques.

La pharmacodynamie (PD) décrit ce que l'antibiotique fait à l'organisme : c'est l'étude détaillée de la façon dont les médicaments agissent.

La pharmacocinétique (PK) étudie le devenir d'un médicament dans l'organisme.

C'est l'interaction entre les propriétés pharmacocinétiques d'une part et pharmacodynamiques d'autre part, qui déterminent, in fine, le niveau d'activité de l'antibiotique.

En fonction des maladies, les bactéries pathogènes sont localisées dans différents sites d'infection (arbre respiratoire, tube digestif, méninges, etc.). L'accès à ce site d'action par l'antibiotique dépend de ses propriétés pharmacocinétiques, de la voie d'administration et de la formulation médicamenteuse.

Le devenir d'un antibiotique chez un sujet traité est décrit par sa pharmacocinétique.

L'effet d'un antibiotique sur une bactérie dépend de son mécanisme d'action, et de la concentration atteinte entraînant un effet sur la croissance et/ou la mortalité bactérienne.

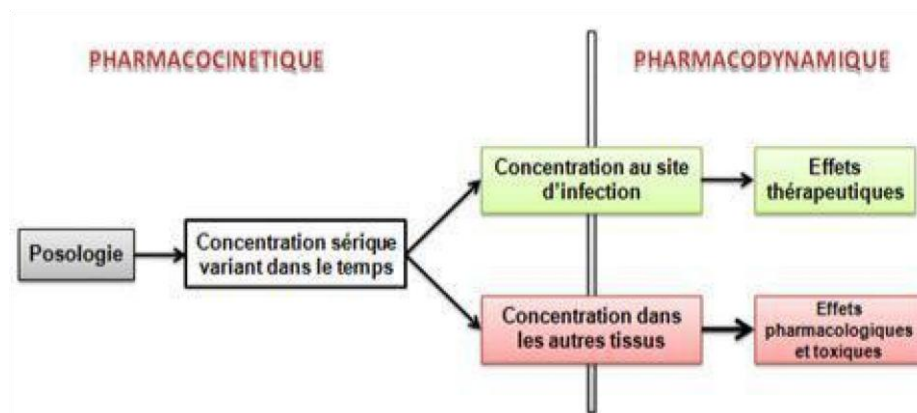
L'effet d'un antibiotique sur une bactérie est décrit par sa pharmacodynamie .(**Hyatt,1995**)

La relation entre la pharmacodynamie et la pharmacocinétique est représenté dans la figure 2.

#### **4.1 Propriétés pharmacodynamiques**

Les paramètres les plus importants pour les antibiotiques sont les suivants :

- Nature de l'effet : bactéricide ou bactériostatique.
- Type de relation dose-effet : temps-dépendant ou concentration-dépendant.
- Existence ou non d'un effet post-antibiotique.



**Figure 2** : Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques .(Hyatt,1995).

##### **4.1.1 Effet antibactérien**

L'action d'un antibiotique se manifeste, pour une concentration déterminée, par un effet antibactérien, qui peut être :

- Un effet bactériostatique : arrêt de la croissance bactérienne.
- Un effet bactéricide : provoque la « mort des bactéries ».

Le tableau 5 présente l'effet antibactérien de quelques antibiotiques :

<b>Bactériostatique</b>	<b>Bactéricide</b>
Macrolides Sulfamidés Tétracyclines Lincosamides Nitrofuranes Phénicolés	β-lactames Fluoroquinolones Aminoglycosides Nitroimidazoles Glycopeptides Polymyxines Synergistines Ansamycines Acide fusidique

**Tableau 5** :Antibiotiques bactériostatiques et bactericides (Meng,1995).

#### **4.1.1.1Effet bactériostatique**

L'effet bactériostatique (bactériostase) consiste en un ralentissement de la croissance de la population bactérienne .

L'effet (ou activité) d'un antibiotique sur une population bactérienne est apprécié par la détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice).(Blaser,1987)

- **La CMI**

**Définition:**

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée.

Entre bactériostase et bactéricidie existe une concentration en antibiotique pour laquelle la population bactérienne ne varie pas par rapport à celle du départ. Cette concentration correspond à la concentration minimale inhibitrice ou CMI . (Benet,1996)

- **Détermination de la CMI :**

La CMI permet d'apprécier in vitro la sensibilité d'une souche vis-à-vis d'un antibiotique mais elle ne reflète pas la réalité thérapeutique.

Déterminer la CMI, consiste à déterminer la concentration en antibiotique inhibant la croissance bactérienne. (Benet,1996)

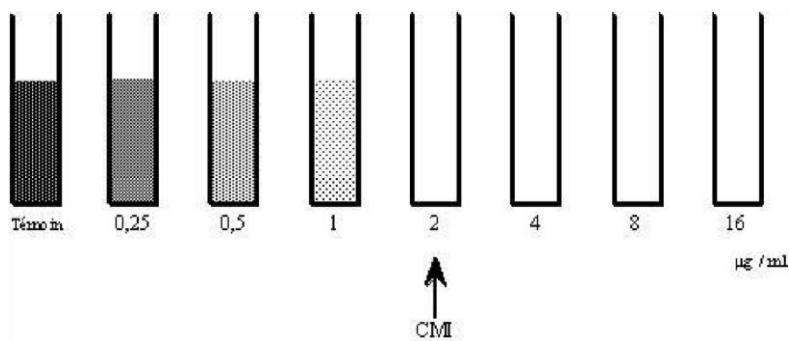
La CMI d'un germe donné peut être mesurée par différents procédés de laboratoire :

**I. Méthode de dilution en milieu liquide**

En milieu liquide, la croissance bactérienne se visualise par un trouble ou un culot bactérien.

On réalise une gamme d'antibiotique de concentrations décroissantes par dilutions successives (Figure.3).

La CMI correspond à la concentration en antibiotique dans le premier tube pour lequel il n'y a pas de croissance visible après 24h à 37°C.



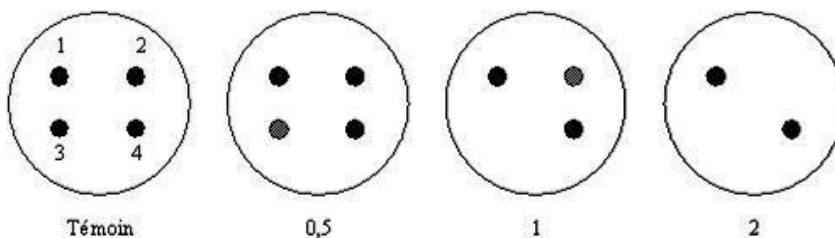
**Figure 3 :** Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide (Konig,1995).



## II. Méthode de dilution en milieu gélosé

Les dilutions d'antibiotique sont incorporées dans une gélose de Mueller-Hinton coulée en boîte de Pétri. Chaque boîte contient une concentration d'antibiotique différente. La surface de la gélose estensemencée par des stries de suspension de bactéries. Une dizaine de souches peuvent être testées sur une boîte (Figure.4).

La CMI correspond à la plus petite concentration en antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne (aucune colonie sur la strie).



**Figure 4** : Détermination de la CMI en  $\mu\text{g/ml}$  par dilution en milieu gélosé. (Konig,1995).III.Méthode E-test<sup>®</sup>

Une bandelette est imprégnée de quantités croissantes d'antibiotique. Elle est placée sur une gélose pour antibiogrammeensemencée classiquement (Figure.5) : l'antibiotique diffuse en formant un gradient de concentration : la zone d'inhibition a la forme d'une ellipse et la lecture est alors directe sur la bandelette là où celle-ci rencontre la zone d'inhibition.

Au point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette, la concentration en antibiotique correspond à la CMI de la souche étudiée.



**Figure 5 : Méthode E-test<sup>®</sup> (Konig,1995).**

#### 4.1.1.2 Effet bactéricide

L'effet bactéricide consiste en la destruction d'une partie de la population d'une souche bactérienne .

Pour tester le pouvoir bactéricide d'un antibiotique sur la souche isolée il faut déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) (cette concentration est toujours supérieure à la CMI).

##### • La CMB

##### **Définition:**

La CMB se définit comme étant la plus faible concentration d'antibiotique capable de détruire 99,99 p. cent d'un inoculum bactérien. **(Kunin,1981).**

##### • Détermination de la CMB :

La CMB est déterminée après une recherche de CMI en milieu liquide (technique de macrodilution ou de micro-dilution).

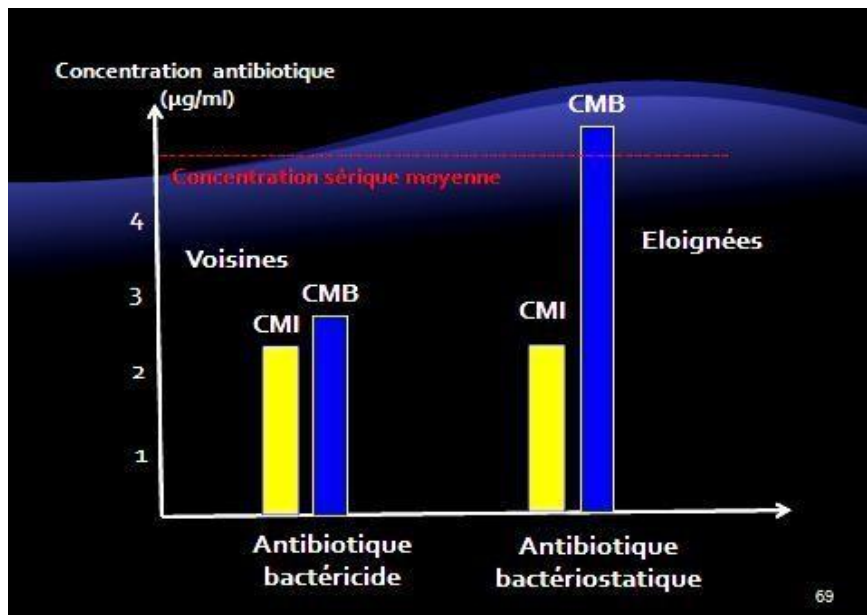
La technique consiste à ensemercer sur un milieu gélosé dépourvu d'antibiotique une quantité définie de tous les tubes ne présentant pas de croissance visible et à dénombrer les bactéries survivantes. Ce nombre est comparé au nombre de bactéries initialement présentes dans l'inoculum.

La CMB correspond à la concentration dans le premier tube pour lequel il n'y a pas de recroissance visible (premier tube stérilisé). **.(Kunin,1981).**

La CMI et la CMB sont voisines pour les antibiotiques bactéricides et éloignées pour les antibiotiques bactériostatiques .

- Ces effets ne doivent pas être considérés à l'échelle d'une seule cellule bactérienne mais à l'échelle de la population.
- On pourrait croire que les antibiotiques bactériostatiques inhibent ou ralentissent la multiplication de la population bactérienne et que les antibiotiques bactéricides tuent les bactéries.

- En réalité les deux types d'antibiotiques exercent sur les bactéries prises individuellement ces deux types d'effets, ralentissement de croissance et mort de la bactérie.



**Figure 6 : Activité bactéricide et bactériostatique.(Craig,1991).**

### **I. Type de relation dose-effet**

#### **a)Relation concentration-intensité de l'effet bactéricide :**

On pourrait penser que l'effet bactéricide d'un antibiotique est simplement proportionnel à sa concentration.

L'étude expérimentale montre que ce n'est pas le cas pour toutes les classes d'antibiotiques et que celles-ci peuvent être divisées en deux groupes :

- le premier constitué par ceux dont l'activité est effectivement très fortement dépendante de leur concentration. On parlera donc d'antibiotique concentration-dépendant.

- le deuxième par ceux dont l'activité n'est pas ou peu influencé par une augmentation de la concentration dès que cette dernière a atteint un niveau seuil (le plus souvent correspondant à une valeur de 3 à 4 fois la CMI). On parlera alors d'antibiotiques temps-dépendants. **(Lorian,1975).**

## **II. Effet post-antibiotique (EPA) et effet sub-inhibiteur**

L'effet post-antibiotique (bactériopause) est l'effet antibactérien observé après suppression du contact de la population bactérienne avec l'antibiotique.

Il correspond à un blocage de la multiplication bactérienne quelques heures après la fin du contact externe avec l'antibiotique.

Par exemple, les aminoglycosides qui inhibent la synthèse protéique exercent un effet postantibiotique important vis-à-vis des bactéries qui ne sont pas tuées pendant le délai d'exposition. La durée de cet effet est proportionnelle à la concentration à laquelle ont été exposées les bactéries.

Par ailleurs, en-dessous de la CMI, tout antibiotique exerce encore des effets antibactériens non négligeables. On parle d'effet sub-inhibiteur (changements morphologiques et structuraux des bactéries, modifications fonctionnelles du développement bactérien, interférences avec les défenses immunitaires de l'hôte ). **(Lorian,1975).**

## **4.2 Propriétés pharmacocinétiques**

Il ne suffit pas de préconiser l'antibiotique auquel la bactérie est sensible pour garantir la guérison. Il faut s'efforcer d'adapter le traitement, non seulement au profil de sensibilité du germe incriminé et à la sévérité de l'infection, mais aussi, à la nature du foyer infectieux et aux capacités de biotransformations et d'excrétion de l'organisme infecté.

La pharmacocinétique (PK) consiste à l'étude qualitative et quantitative du devenir d'un médicament après son administration dans l'organisme.

La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future.

La PK correspond à l'étude de la cinétique de la résorption, de la distribution, du métabolisme et de l'élimination des médicaments.

La distribution, le métabolisme et l'élimination d'une molécule dépendent de ses propriétés physico-chimiques et de son interaction avec l'organisme **(Schumacher,1982).**

#### **4.2.1 Résorption**

Dans l'organisme, l'antibiotique est résorbé pour atteindre le milieu sanguin. La voie d'administration préférentielle est celle qui aboutit à une absorption optimale. La dose administrée (dose externe) n'est pas forcément égale à la dose qui va réellement agir encore appelée dose interne.

La relation entre la dose administrée et la dose interne est donnée par le facteur de biodisponibilité. La mesure de la biodisponibilité est également informative pour les médicaments administrés localement afin d'anticiper la présence ou non d'effet systémique ou de résidus de médicaments pour la médecine vétérinaire (**Schumacher,1982**).

#### **4.2.2 Distribution**

A la suite de l'administration d'un médicament contenant un antibiotique, les concentrations varient dans le temps et dans les différents compartiments de l'organisme.

A partir du sang, l'ATB passe dans les compartiments interstitiels et cellulaires.

La diffusion dans le compartiment interstitiel se fait rapidement à cause de la grande perméabilité de la membrane capillaire.

Par contre, la pénétration à l'intérieur de la cellule est un phénomène beaucoup plus lent, fortement influencé par la lipo-solubilité, le degré d'ionisation et l'affinité de l'antibiotique pour les composants intracellulaires.

Ces facteurs permettent de distinguer les antibiotiques à bonne diffusion tissulaire (Macrolides, Fluoroquinolones) de ceux à diffusion médiocre (Pénicillines et Céphalosporines) ou nulle (Aminosides, Polymyxines).

Dans le sang, l'ATB se présente sous forme liée (de façon réversible) aux protéines plasmatiques, particulièrement l'Albumine.

Cette forme liée n'est pas diffusible. C'est sous forme libre que l'antibiotique diffuse à l'intérieur de la cellule donc au site d'action. La fraction liée représente une sorte de réserve qui permet de reconstituer la fraction libre dès que cette dernière diminue.

Le degré de liaison aux protéines est en fonction de l'affinité plus ou moins grande de l'antibiotique pour les protéines sériques (Exemple : Taux de liaison pour l'Oxacilline → 85 %).

On définit la demi-vie sérique comme étant le temps que met la concentration sérique pour diminuer de moitié. Plus la demi-vie est longue, plus longue est l'activité de l'antibiotique donc plus les doses peuvent être espacées).

Exemple : La pénicilline G, l'Oxacilline ont une demi-vie très courte, inférieure à 1 h ; l'Ofloxacin, la Doxycycline ont une demi-vie longue (supérieure à 7 h) (**Stone,1985**).

### 4.2.3 Biotransformations

Les substances actives peuvent être métabolisées par différents organes. Si toutes les cellules de l'organisme possèdent une capacité métabolique de base, certains organes ont une capacité métabolique importante (foie, rein, poumon).

La transformation d'une molécule par le métabolisme dépend de la structure de la molécule et des voies métaboliques exprimées chez l'animal. Certaines molécules sont rapidement dégradées en métabolites inactifs au plan de l'activité antimicrobienne tandis que d'autres sont peu métabolisées ou que le métabolisme conduit à des métabolites actifs au plan microbiologique.

Les ATB peuvent être ou non transformés dans l'organisme, certains sont totalement ou partiellement inactivés (exemples : Céfaloine, Erythromycine).

Les transformations subies sont :

- la désacétylation ou déméthylation
- la glucurono-conjugaison
- l'hydroxylation

D'autres ATB sont éliminés tels quels, sous forme active (Pénicillines, Aminosides, Céphalosporines, Polymyxines). (**Stone,1985**).

### 4.2.4 Elimination

Elle fait intervenir plusieurs voies : rénale, biliaire, lait, œufs...etc. :

- L'élimination rénale se fait par filtration glomérulaire et sécrétion au niveau du tube contourné proximal, avec parfois, possibilité de réabsorption tubulaire dépendante du pH urinaire.

Exemples d'antibiotiques éliminés par le rein : pénicillines, céphalosporines, aminosides.

- Au niveau hépatique, l'ATB est excrété par la bile avec possibilité de réabsorption intestinale par le biais du cycle entéro-hépatique. Exemples d'antibiotiques éliminés par la bile : (Ampicilline, Rifamycines, Macrolides)

La capacité d'élimination d'un principe actif, est exprimée par la clairance totale (ou clairance plasmatique) qui est la somme des différentes clairances (clairance métabolique du foie, clairance d'excrétion biliaire, clairance d'excrétion rénale...). Ces clairances peuvent présenter de grandes variabilités interspécifiques

Les antibiotiques peuvent être excrétés dans le lait après une administration générale comme à la suite d'un traitement intra-mammaire ou d'une application intra-utérine Les œufs de poules pondeuses constituent une voie d'élimination

rapide et importante pour certains antibiotiques ce qui explique l'interdiction de certain ATB dont l'œufs sont destinés à la consommation humaine (Stone,1985).

Famille ou molécule(s)	Activité	Mécanisme d'action (cible)	Spectre d'activité
Pénicilline G	Bactéricide	Inhibition de la synthèse de la paroi	Etroit (Gram +), étendu aux Gram - pour les plus récentes
Pénicillines groupe M			
Pénicillines groupe A			
Céphalosporines			Large
Colistine	Bactéricide	Perturbation de la membrane plasmique	Entérobactéries
Bacitracine		Inhibition de la synthèse de la paroi	Cocci Gram + et -, bacilles Gram +, Spirochète
Aminosides sauf spectinomycine	Bactéricide	Inhibition de la synthèse protéique (ribosomes)	Etroit (Gram – et streptocoques) sauf gentamicine
Spectinomycine	Bactériostatique		
		Inhibition de la synthèse protéique	Gram + +++,  Quelques

Macrolides	Bactériostatique	(ribosomes)	Entérobactéries
Tétracyclines	Bactériostatique	Inhibition de la synthèse protéique (ribosomes)	Large
Florfénicol	Bactériostatique	Inhibition de la synthèse protéique (ribosomes)	Large
Lincosamides	Bactériostatique	Inhibition de la synthèse protéique (ribosomes)	Cocci et bacillus Gram +, mycoplasmes, Anaérobies
Sulfamides	Bactériostatique	Inhibition de la synthèse protéique (ADN)	Large
Quinolones (1ère génération)	Bactéricide	Inhibition de la synthèse protéique (ADN)	Etroit (Gram +), étendu aux
Quinolones (2ème et 3ème génération)			Gram - selon la Génération

**Tableau 6 :** Propriétés antibactériennes et indications principales des antibiotiques.(Enriquez et al,2002).



## **5.Association d'antibiotiques**

Dans certains cas, il peut être intéressant d'associer plusieurs antibiotiques : pour élargir le spectre d'activité (cas des infections à germes multiples par exemple), bénéficier d'un effet synergique, ou encore diminuer les risques de sélectionner une souche bactérienne résistante.

Chaque molécule est alors bénéfiques : (cas de l'association de certains bactériostatiques), indifférentes, voire antagonistes (cas de l'association de certains bactéricides avec des bactériostatiques), ce qui annule les effets thérapeutiques des administrée à la posologie préconisée lors d'utilisation individuelle. Néanmoins, il faut respecter certaines règles, car toutes les associations ne sont pas molécules utilisées. L'association implique également le risque d'ajouter des toxicités propres, d'augmenter la sensibilisation de l'organisme et surtout de créer un vide bactériologique par attaque des bactéries commensales de l'animal, favorisant l'installation de colonies bactériennes résistantes à ces antimicrobiens. Pour toutes ces raisons, associer plus de deux antibiotiques n'est pas conseillé (**Enriquez, 2002**).

### **5.1Règles d'associations d'antibiotiques**

Le vétérinaire doit éviter au maximum le recours aux associations d'antibiotiques sinon il doit être convaincu que les avantages sont plus nombreux que les inconvénients, tout l'art du prescripteur consistant à comparer les avantages aux inconvénients (**Person,1990**).

Les situations nosologiques où il est permis d'utiliser une association d'antibiotiques sont:

1. infections sévères.
2. infections polymicrobiennes (infection de la sphère digestive, respiratoire ou cutanée).
3. afin d'élargir le spectre d'action de ces drogues si le taxon bactérien causant la maladie n'est pas connu (surinfections dues à des viroses respiratoires ou infection de la sphère digestive).
4. prévenir l'émergence de germes mutants résistants.
5. utiliser chaque antibiotique à des doses inférieures aux Concentrations Minimales Inhibitrices (C.M.I.) normales.
6. infections localisées à germes peu prolifératifs (arthrites, ostéites).

La polythérapie antimicrobienne doit se limiter à la bithérapie ; certains antibiotiques ne peuvent jamais être utilisés en monothérapie sinon il y a un risque de développement de mutants (fosfomycine, rifampicine, streptomycine et novobiocine).

Certaines associations sont proscrites quel que soit le contexte nosologique. Il ne faut jamais associer deux antibiotiques appartenant à une même famille ni deux antibiotiques ayant la même toxicité. **(Pirabot et al,1985).**

Les règles d'associations des antibiotiques qui sont connues sous le nom de Lois de Jawetz représentent la situation générale avec des exceptions fréquentes; elles sont théoriques et doivent prendre en ligne de compte le contexte épidémio clinique et les résultats de laboratoire **(Person,1990).**

### **5.2 Conséquences d'association d'antibiotiques**

Trois types d'effets sont possibles lorsque l'on combine deux antibiotiques : un effet additif, un effet synergique et un effet antagoniste (Tableau7).

<b>Effet additif</b>	L'effet total est égal à la somme des effets des 2 antibiotiques utilisés séparément
<b>Effet Synergique</b>	L'effet total est supérieur à la somme des effets des 2 antibiotiques utilisés séparément
<b>Effet Antagoniste</b>	L'effet total est inférieur à la somme des effets des 2 antibiotiques utilisés séparément

**Tableau 7 : Effets possibles d'une combinaison d'antibiotiques (Enriquez et al,2002).**

Les associations antibiotiques synergiques sont assez rares par rapport aux associations antagonistes. Les associations simplement additives ou indifférentes sont nombreuses. Il est à noter que de nombreuses spécialités antibiotiques disponibles associent déjà plusieurs molécules antibiotiques de familles différentes **(Pirabot et al,1985).**

<b>Famille</b>	<b>Associations possibles</b>	<b>Associations synergiques</b>	<b>Associations à éviter</b>
Tétracyclines	Phénicolés,  Macrolides,  Sulfamides		Pénicillines, Céphalosporines, Quinolones
Phénicolés	Bactériostatiques, Aminosides, polypeptides		Pénicillines, Céphalosporines, Macrolides,  Fluoroquinolones,  Tétracyclines
Macrolides	Bactériostatiques, Aminosides, polypeptides		Pénicillines, Céphalosporines, Phénicolés
Lincosamides	Idem macrolides		Idem macrolides
Sulfamides	Presque tous	Triméthop- rime	
Diaminopy- rimidines		sulfamides	Tous les autres
Pénicillines	Aminosides, polypeptides,  Quinolones	Aminoside s, quinolones	Bactériostatiques
Céphalosporine s	Idem pénicillines		Idem pénicillines

Aminosides	Bactériostatiques, Bactéricides	Pénicillines, lincosamids	Tétracyclines, Phénicolés, Polypeptis
Polypeptides (sauf bacitracine)	Bactériostatiques, Bactéricides		Aminosides
Quinolones	Bactériostatiques, Bactéricides	Beta- lactamines	Phénicolés, Tétracyclines

**Tableau 8 :** Association possibles de différentes familles antibiotiques utilisées en médecine .(Enriquez et al,2002).

# Bibliographie

- **Adam.F , Drouillard.I.** Sulfamides et associations. *Encycl Méd Chir , Maladies infectieuses*,8-004-A-10, 2003 , p9.
- **Andremont.A , Corpet.D , Courvalin.P** , (1997). La résistance des bactéries aux antibiotiques. *Pour la science*, 232, p 66–73.
- **Baker.T.A , Bell.S.P**,« Polymerases and the replisome: machines within machines. », *Cell*,vol. 92, 1998, p 295-305.
- **Benet.L.Z , KroetzD.L , Sheiner.B.** Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination. *In* J.G. HARDMAN, L.E.LIMBIRD, P.B. MOLINOFF, R.W. RUDDON, and A. GOODMAN GILMAN (ed) *The pharmacological basis of therapeutics* , McGraw-Hill, New York, NY, USA, 1996. p3-28.
- **Bezoen.A , Van Haren.W , Hanekamp. JC** ;Emergence of a debate : AGPs and public health, 1999, p19-110.
- **Bingen.E , Leclercq.R**,ANTIBIOGRAMME COURVALAIN.P, Chloramphénicol, fosfomycine, acide fusidique et polymixines.*In* : 2ème édition, 2006 ,P349-364.
- **Blaser.J., Stone.B , Zinner.S.H.** - Comparativestudy with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance.*Antimicrob Agents Chemother* 31: 1987 p1054-1060.
- **Brosius.J. , M. L. Palmer, P. J. Kennedy et H. F. Noller**, « Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli* », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 75, 1<sup>er</sup> octobre 1978, p 4801– 4805.
- **Corpet D** : Après les hormones, les antibiotiques ?, dossier : antibiotiques la résistance des bactéries *Larecherche*, 1998, p8-10.

- **Craig.W.A , Ebert.S.C.** - Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review. *Scand J Infect Dis*74 (Suppl.), 1991, p 63-70.
- **Cuot P , Poyart C** Visite guidée au cœur de l'arsenal antibactérien, dossier : antibiotiques la résistance des bactéries Larecherche, 1998, p11-15.
- **Damase Michel , revue Prescrire**, août 1998; Volume 18, 186; ISSN 0247-7750; pages 530-534.
- **Enriquez.B.** Les antibiotiques en médecine vétérinaire. Pharmacie et Toxicologie expérimentales et cliniques : notions générales sur les antibiotiques, les antibiotiques antibactériens, les antibiotiques antifongiques. Polycoopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Pharmacie et Toxicologie. 2002, p 157.
- **Enriquez.B .** Sulfamides, quinolones, nitrofuranes et nitroimidazolés à propriétés antibactériennes. Polycoopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Pharmacie et Toxicologie. 2002, p 70.
- **Fedesa.** Antibiotics for animals. A FEDESA perspective on Antibiotics, Animal Health and the Resistance Debate. 1999, p 8.
- Francois.J , Chomarat.M , Weber.M , Gerard.A:**De l'antibiogramme à la prescription.  
BIOMERIEUX, 2ème édition, 2003 , p8-22.
- **Goldstein.F.** Sulfamides et triméthopriime In : ANTIBIOGRAMME COURVALAIN.P, LECLERCQ.R, BINGEN.E 2ème édition, 2006 , P341-348.
- **Heather L. Van Epps, René Dubos:** unearthing antibiotics, *J. Exp. Med.*2006 , p 203.
- **Helmuth R , D. Protz** 1997. How to modify conditions limiting resistance in bacteria in animal and other reservoirs ? *Clin. Infect. Dis.* 24: (Suppl. 1) p, 136 – 138.

- **Hemmingsen B, Schroll JB, Wetterslev J et al** , CMAJ Open., doi:10.9778/cmajo. 2014, p 162 -75.
- **Hyatt.J.M.** - The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *ClinPharmacokinet* 28: 1995, p143-160.
- **jacques acar**, 1999, antibiotiques agents antibactériens et antiifongiques. voll, p 1216.
- **Johanne Collin** ; Rationalité et irrationalité à l'origine du mésusage des médicaments. Médicament et société. Par. Adsp n° 27 juin 1999, P 57.
- **Kaplan SL, Mason EO Jr**, « Management of infections due to antibioticresistant », *ClinMicrobiol Rev*, vol. 11, n° 4, 1998, p 628-44.
- **Konig.C , Blaser.J** ; Once-daily dosing of aminoglycosides. *Eur J Microbiol Infect Dis* 14, 1995, p1029-1038.
- **Kunin.C.M.** - Dosage schedules of antimicrobial agents: a historical review. *Rev Infect Dis*3, 1981, p 4-11.
- **Lafont.J-P , Martel.J-L , Maillard.R , Vade-Mecum** thérapeutique. In : Antibiothérapie bovine. Acquis et consensus. Pfizer. Maisons-Alfort : les Editions du Point vétérinaire, 2002, p 17-34.
- **Leclercq.R**; Macrolides lincosamides streptogramines In : ANTIBIOGRAMME COURVALAIN P., LECLERCQ R., BINGEN E. 2ème édition, 2006 , P299-324.
- **Lorian.V , Atkinson.B.** - Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Am J Clin Pathol* 64:, 1975, p678-688.
- **Maillard.R.** Les principales familles d'antibiotiques. *La dépêche technique*, 2002, 80 (Suppl), p 3-9.
- **Maillard.R.** L'âge d'or des antibiotiques : la légende du siècle passé. In: LAFONT J-P., MARTEL J-L., MAILLARD R. *et al.* Antibiothérapie



- bovine. Acquiset consensus. Pfizer. Maisons-Alfort : les Editions du Point vétérinaire, 2002, p 37-46.
- **Mcdermott.M ,Rogers.D.E**, « Socialramificationsof control ofmicrobial disease »,The Johns Hopkins Medical journal , vol. 151, 1982, p 302-312.
  - **Meng.X , Nightingale.C.H , Quintiliani.R.** -Determination of the in vivo post-antibiotic effect of ciprofloxacin and rifampicin. JAntimicrob Chemother 36: 1995 ,p 987-996.
  - **Merck Veterinary Manual, (2008).** Résistance des micro-organismes aux agents antibactériens. In Le Manuel Vétérinaire Merck. 3rd ed française, Edition d'Après, Paris, p 2053–2054
  - **Oms , 2001.** WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance.
  - **Pacot C Thèse** « Influence des traitements anti-infectieux sur l'apparition et la persistance d'E.colirésistants aux antibiotiques dans la flore fécale du porc », 2003, p1315 et p21-42.
  - **Palumbi Stephen**, « Humans as the world's greatest evolutionary force »,Science, vol. 293, 2001, p 1786-1790.
  - **Person .J. M.** 1990. Les associations d'antibiotiques en thérapeutique des carnivores. Rec. Méd. Vét. - Numéro Spécial: anti-infectieux. 166: 3, p 251 - 257.
  - **Pirabot M.L , N. Brion , C. Carbon** 1985. Les principes généraux de la prescription d'une antibio-thérapie. *Rev. du Praticien.* 35: 15, p821 - 825.
  - **Poyart.C.**Tétracyclines In : ANTIBIOGRAMME COURVALAIN.P, LECLERCQ.R, BINGEN.E 2ème édition, 2006 , P 325-334.
  - **Ronald Bentley , J.W. Bennett**, « What Is an Antibiotic? Revisited», *Advances in Applied Microbiology*, vol. 52, 2003, p 303-331 .

- **Sanders .p** 2005. L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. *Bull. Acad. Vét. France*. Tome 158, p 137-143.
- **Schumacher .G.E.** - Pharmacokinetic and microbiologic evaluation of antibiotic dosage regimens. *Clin Pharm* 1, 1982, p 66-75.
- **Schwarz.S , Chalus-dancla.E.** 2001: Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res* 32, p 201-225.
- **Stone.B., Bliaser.J, Zinner.S.H.** - Impact of netilmicin regimens on the activities of ceftazidimenetilmicin combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 28, 1985:p 64-68.

# CHAPITRE II

**impact de l'usage des antibiotiques sur  
la resistance bacterienne chez l'animal**

Les antibiotiques sont utilisés essentiellement en tant que médicaments vétérinaires pour la prévention, le traitement et le contrôle de maladies animales d'étiologie bactérienne. Quelques molécules sont ou ont été utilisées comme additifs à l'alimentation animale pour leur effet comme facteurs de croissance. Certaines molécules ayant une activité coccidiostatique ont également un effet antibiotique. Pour étudier l'effet de ces traitements antibiotiques chez l'animal sur la résistance aux antibiotiques chez les bactéries, il faut d'abord rappeler la définition de la résistance. Les antibiotiques partagent avec les médicaments antiparasitaires, la particularité que leurs cibles thérapeutiques ne sont pas des processus biologiques du sujet traité mais des cibles (bactéries ou parasites pathogènes) présentes chez ce sujet. La sensibilité de ces cibles, et a contrario, leur résistance à l'antibiotique, se définit vis-à-vis des concentrations en antibiotique ayant un effet sur leur développement au sein du sujet. En plus de ces cibles thérapeutiques, le traitement antibiotique peut avoir un effet sur la flore bactérienne, non pathogène, dite flore commensale, hébergée par ce sujet traité au niveau du tube digestif, sur des muqueuses ou sur la peau. En perturbant le développement des populations bactériennes sensibles, sans affecter les populations bactériennes résistantes, les traitements antibiotiques vont modifier leurs proportions relatives chez les sujets traités. Une partie des quantités d'antibiotiques administrées, ainsi qu'une partie des bactéries hébergées par les animaux sera rejetée dans l'environnement ou se retrouvera

sur ou dans les produits alimentaires issus de ces animaux. Ces différents phénomènes décrivent l'impact des antibiotiques sur la résistance.

L'évaluation de ces phénomènes, l'étude de la relation entre les usages et la résistance aux antibiotiques supposent de disposer de données recueillies via des études épidémiologiques et des systèmes de surveillance pour compléter les informations issues des études bactériologiques et pharmacologiques.

Le présent chapitre a pour objet de définir la notion de résistance aux antibiotiques et les modalités de mesure de cette résistance chez les bactéries. Les modalités de surveillance épidémiologique de la résistance seront discutées selon leurs objectifs et en fonction de la pertinence des indicateurs utilisés. Les travaux, réalisés chez les animaux producteurs de denrées alimentaires, sur l'impact des traitements antibiotiques sur le développement de la résistance seront présentés et discutés d'un point de vue épidémiologique en terme de causalité. Enfin, l'impact des traitements antibiotiques sur le transfert dans l'environnement d'antibiotiques et de bactéries résistantes sera analysé ainsi que les modalités d'analyse de risque associé aux résidus d'antibiotiques.

## **I. Définitions de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

### **1. Rappels de pharmacologie**

En fonction des maladies, les bactéries pathogènes sont localisées dans différents sites d'infection (arbre respiratoire, tube digestif, méninges, etc.). L'accès à ce site d'action par l'antibiotique dépend de ses propriétés pharmacocinétiques, de la voie d'administration et de la formulation médicamenteuse. Le devenir d'un antibiotique chez un sujet traité est décrit par sa pharmacocinétique.

L'effet d'un antibiotique sur une bactérie dépend de son mécanisme d'action, et de la concentration atteinte entraînant un effet sur la croissance et/ou la mortalité bactérienne. L'effet d'un antibiotique sur une bactérie est décrit par sa pharmacodynamie.

#### **1.1. Pharmacocinétique**

La pharmacocinétique décrit les quatre phases du devenir d'une molécule dans un organisme qui sont l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion. La distribution, le métabolisme et l'excrétion d'une molécule dépendent de ses propriétés physico-chimiques et de son interaction avec l'organisme.

### Absorption et biodisponibilité

L'absorption d'une molécule, c'est-à-dire son passage du site d'administration à la circulation sanguine est fonction à la fois des propriétés de la molécule et des modalités d'administration notamment de la voie (orale, parentérale) et de la formulation du médicament. La biodisponibilité d'un antibiotique, c'est-à-dire la fraction absorbée qui atteint la circulation générale et la vitesse d'absorption, dépend également des conditions de l'administration. Ainsi pour la voie orale, le médicament pourra être administré par l'eau de boisson, par l'alimentation, par l'utilisation de formes pharmaceutiques comme les comprimés, gélules, etc. Des facteurs tels que la qualité de l'eau, la composition de l'aliment, la période par rapport au repas peuvent influencer la biodisponibilité du principe actif.

### Distribution

A la suite de l'administration d'un médicament contenant un antibiotique, les concentrations varient dans le temps et dans les différents compartiments de l'organisme.

Les concentrations atteintes dans différents compartiments de l'organisme qui sont des sites d'action potentielle de l'antibiotique varient au cours du temps et sont différentes à un temps donné. Cependant les concentrations au sein des organes internes de l'animal exprimées sous forme de concentrations tissulaires atteignent au cours du temps un état d'équilibre avec la concentration sanguine exprimée sous forme de concentration plasmatique ou sérique. Pour le pharmacocinéticien, les concentrations plasmatiques (libres) sont le meilleur critère de substitution de la pharmacocinétique de la molécule au niveau de la biophase c'est-à-dire du site d'action de l'antibiotique. Cela exige qu'il n'existe pas de barrière spécialisée entre le sang et la biophase (comme la barrière hémato-encéphalique) ou encore de barrière pathologiques (débris, tissus nécrosés...). Cette valeur prédictive des concentrations plasmatiques est liée au fait qu'une majorité d'infections sont dues à des bactéries pathogènes à localisation extracellulaire. Toutefois, la structure des organes avec leur compartiment extravasculaire, les compartiments extracellulaire et intra-cellulaire et au sein de la cellule, les sous structures cellulaires, créent des gradients de concentration expliquant que les concentrations totales dans un tissu peuvent être très différentes des concentrations plasmatiques. Il importe de remarquer que les concentrations tissulaires totales obtenues sur un broyat d'un tissu ne peuvent pas être utilisées pour prédire les concentrations au niveau de la bactérie. En revanche, il est généralement accepté que les concentrations actives au niveau de bactéries extracellulaires sont similaires à celles des concentrations libres des liquides extracellulaires et du plasma.

### Métabolisme

Les substances actives peuvent être métabolisées par différents organes. Si toutes les cellules de l'organisme possèdent une capacité métabolique de base, certains organes ont une capacité métabolique importante (foie, rein, poumon). La transformation d'une molécule par le métabolisme dépend de la structure de la molécule et des voies métaboliques exprimées chez l'animal. Certaines molécules sont rapidement dégradées en métabolites inactifs au plan de l'activité antimicrobienne tandis que d'autres sont peu métabolisées ou que le métabolisme conduit à des métabolites actifs au plan microbiologique. Si chez les mammifères, les voies métaboliques de base sont similaires, leur importance dans le métabolisme diffère d'une espèce à l'autre. Chez les autres vertébrés, des processus métaboliques comparables existent. Chez les poissons, les processus d'élimination dépendent des conditions de température.

### Excrétion

Les concentrations dans un certain nombre de sécrétions ou excréta de l'organisme (bile, urine, lait, salive, mucus pulmonaire, sécrétion intestinale, sueur, etc.) varient au cours du temps en fonction des modalités d'excrétion passive ou active de la molécule et de ses métabolites. L'étude de la cinétique plasmatique d'une molécule après administration intraveineuse et la mesure des quantités émises sous forme de substance parentale et de métabolites, estimée sur la base des concentrations moyennes mesurées sur des quantités d'excréta collectés au cours du temps, permet de mesurer la clairance totale et la part relative de la clairance métabolique et de la contribution des principaux organes d'élimination.

La capacité d'élimination d'un principe actif, est exprimée par la clairance totale (ou clairance plasmatique) qui est la somme des différentes clairances

(clairance métabolique du foie, clairance d'excrétion biliaire, clairance d'excrétion rénale...). Ces clairances peuvent présenter de grandes variabilités interspécifiques. La concentration plasmatique moyenne ( $C_{moy}$  à l'état d'équilibre d'un médicament au cours d'un traitement est reliée à la dose d'entretien (D) par l'équation suivante qui prend en compte l'ensemble des paramètres pharmacocinétiques ( $F$  = biodisponibilité,  $Cl$  = Clairance plasmatique).

$$C_{moy} = \frac{F \cdot D}{Cl}$$

Compte tenu de la complexité des étapes impliquées dans la pharmacocinétique d'un antibiotique, les concentrations mesurées à un instant  $t$  chez différents animaux traités à la même dose, avec le même médicament,

par la même voie d'administration, ont une variabilité importante qui s'accroît avec le temps.

#### Paramètres pharmacocinétiques

Les courbes de concentrations au cours du temps sont analysées par des méthodes mathématiques permettant de calculer les valeurs de paramètres pharmacocinétiques résumant les propriétés des molécules et des formulations étudiées. Les principaux paramètres classiquement utilisés sont résumés dans le tableau 10.

#### A retenir

La pharmacocinétique d'une molécule se résume en 4 phases concomitantes (absorption, distribution, métabolisme, excrétion). Les concentrations plasmatiques (ou sériques) représentent la meilleure information prédictive de l'exposition des bactéries présentes au sein des tissus. Ces concentrations varient en fonction de l'espace (site d'action) et du temps. Les antibiotiques ont des comportements pharmacocinétiques différents selon les espèces animales et une variabilité importante entre sujets d'une même espèce. La pharmacocinétique d'un antibiotique est très influencée par la voie d'administration et la formulation du médicament le contenant.

Une même dose de médicament ne signifie pas les mêmes concentrations au sein des différentes espèces animales du fait de ces multiples facteurs de variation.

La concentration totale en antibiotique mesurée dans un tissu est un mauvais estimateur de la concentration active en antibiotique au site d'action (biophase). La concentration plasmatique ou sérique est le meilleur indicateur disponible mais n'est pas le reflet de la concentration locale dans les émonctoires (urine, fèces) et les sécrétions (lait).

### **1.2. Pharmacodynamie**

#### Mode d'action

La cible pharmacologique d'un antibiotique est la bactérie pathogène. Les différentes classes d'antibiotiques ont des mécanismes d'action différents et



le plus souvent plusieurs effets sur une bactérie. Les cibles d'action des antibiotiques sont variées : ribosomes, paroi bactérienne, topoisomérase, etc. avec comme conséquences l'inhibition de la synthèse protéique, l'inhibition de la synthèse de la paroi, l'altération de la structure des acides nucléiques. Ces mécanismes d'action font entrer en jeu des interactions entre antibiotique et cible d'action, avec par exemple fixation de l'antibiotique sur une cible bien déterminée. L'action de l'antibiotique sur une espèce bactérienne dépend donc de la présence de la cible au sein de la cellule bactérienne ou de la capacité d'accès à cette cible.

D'un point de vue pharmacodynamique, les antibiotiques ont un effet, variant selon la concentration, allant du ralentissement de la croissance bactérienne (effet sub-inhibiteur), à l'inhibition de la croissance (effet bactériostatique) à la mort de la bactérie (effet bactéricide) (Figure 8).

Les effets des antibiotiques sur une population bactérienne peuvent être étudiés *in vitro* par différents tests dits statiques ou dynamiques (Tableau 11). Les principaux tests statiques déterminent l'état de la population bactérienne après un temps d'exposition à une concentration d'antibiotique. On peut ainsi déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour une souche donnée. La CMI est la première concentration en antibiotique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée. La concentration ayant réduit la population d'un facteur 1000 est définie comme la concentration minimale bactéricide (CMB).

Ces valeurs de CMI et CMB sont dépendantes des conditions de culture de la bactérie notamment du milieu de culture, de la température d'incubation et de l'atmosphère de l'enceinte de culture. Les conditions de détermination d'une CMI doivent donc être standardisées pour assurer la comparabilité des résultats entre laboratoires. Les méthodes sont optimisées pour déterminer l'action de l'antibiotique sur une bactérie en croissance. En effet, la plupart des antibiotiques ne sont actifs que sur des bactéries en répllication car leurs cibles d'action sont des étapes des processus de synthèse protéique, de synthèse des membranes ou de la paroi, de synthèse de l'ADN. Très peu d'antibiotiques sont actifs sur des bactéries en non croissance.

Récemment, des tests de détermination de l'effet des concentrations sur la sélection de mutants résistants aux antibiotiques ont été proposés (**Allen et al., 2003**). Ces tests déterminent la concentration prévenant l'apparition de mutants.

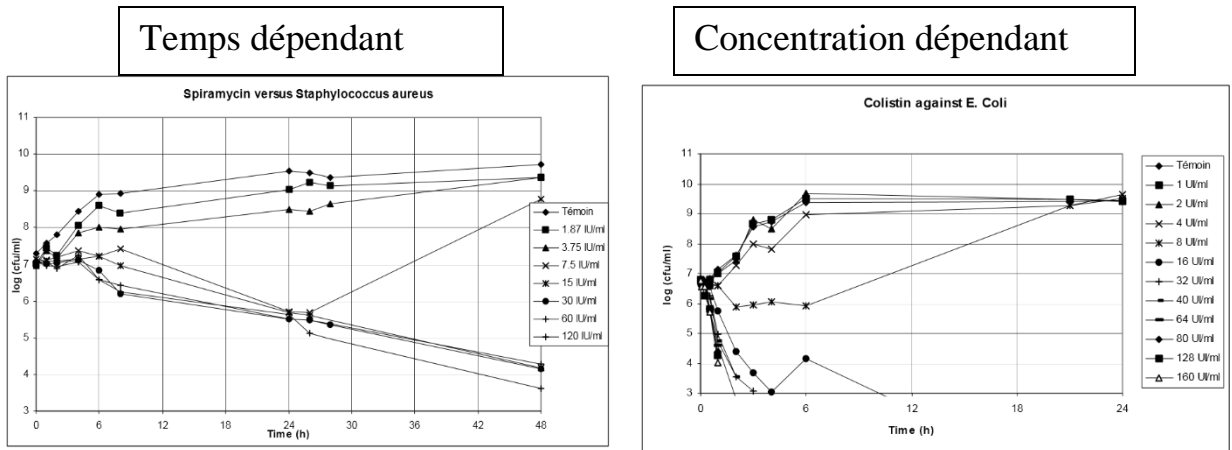
Les tests dynamiques déterminent l'évolution au cours du temps de la population bactérienne par des techniques de dénombrement. On peut ainsi étudier la cinétique de bactéricidie ou l'effet post antibiotique qui détermine le temps nécessaire à la recroissance après exposition à une concentration d'antibiotiques suivie de son retrait de l'antibiotique. Ces tests peuvent être

réalisés avec des concentrations statiques en antibiotique ou des concentrations variables reproduisant la cinétique plasmatique. De nombreux modèles de tests *in vitro* sont décrits dans la littérature et ils sont utilisés durant les phases de développement pré-clinique de l'antibiotique.

**Tableau 10 : Principaux paramètres pharmacocinétiques**

Nom	Acronyme	Unité	Définition
Aire sous la courbe	ASC AUC	$\mu\text{g.h.ml}^{-1}$	Surface sous-tendue par la courbe des concentrations en fonction du temps
Temps de demi-vie plasmatique	$T_{1/2}$	h	Temps nécessaire à la division par 2 des concentrations plasmatiques dans la phase terminale
Clairance plasmatique	Cl	$\text{ml.h}^{-1}$	Constante de proportionnalité entre le taux d'élimination d'une molécule et ses concentrations plasmatiques
Concentration maximale	$C_{\text{max}}$	$\mu\text{g.ml}^{-1}$	Concentration maximale observée de molécule dans le plasma
Temps d'obtention de $C_{\text{max}}$	$T_{\text{max}}$	h	Temps d'obtention de la concentration maximale
Concentration minimale	$C_{\text{min}}$	$\mu\text{g.ml}^{-1}$	Concentration minimale obtenue avant l'administration suivante

Concentration à l'équilibre	C <sub>eq</sub> C <sub>ss</sub>	μg.ml <sup>-1</sup>	Concentration plasmatique moyenne à l'état d'équilibre c'est-à-dire lorsque les quantités de médicament administrées sur l'intervalle de dosage compensent les quantités éliminées
Fraction biodisponible	F		Fraction de la dose atteignant la circulation sanguine systémique (artérielle)



**Figure 8** : Courbes de bactéricidie (taille de la population exprimée en unités formant colonies (UFC) en fonction du temps) obtenues avec différentes concentrations en antibiotique pour un antibiotique tempsdépendant (spiramycine contre *Staphylococcus aureus* (Renard et al., 1993) et un antibiotique concentration dépendant (Colistine contre *Escherichia coli* (Renard et al., 1996).

**Tableau 11** : Paramètres pharmacodynamiques

Nom	Acronyme	Unité	Définition
Concentration minimale inhibitrice	CMI	µg/ml	Première concentration en antibiotique sans croissance visible de la population bactérienne
Concentration minimale bactéricide	CMB	µg/ml	Première concentration en antibiotique permettant une réduction d'un facteur 1000 de l'inoculum
Concentration prévenant l'apparition de mutant	CPM	µg/ml	Première concentration en antibiotique sans apparition de mutants résistants au sein d'un inoculum.
Effet post-antibiotique ( <i>in vitro</i> )	EPA	H	Différence de temps nécessaire à l'obtention d'une recroissance d'un log par rapport à un témoin sans antibiotique.

#### Relation concentration-effet

La relation entre la concentration en antibiotique et l'effet sur une population bactérienne peut être définie par un modèle simplifiée de croissance et mort bactérienne (Zhi et al., 1988).  $\frac{dB}{dt} = (g - ECE_{max} \frac{n}{1 + c^n}) \cdot B$

Où g est la vitesse de croissance ( $h^{-1}$ ), Emax, la vitesse maximale de décroissance obtenue avec l'antibiotique ( $h^{-1}$ ), EC<sub>50</sub> la concentration en antibiotique permettant d'atteindre 50 % de la vitesse maximale, n un facteur de sigmoïdité de la courbe de réponse en fonction de la concentration, B est le nombre de bactéries par unité de volume (cfu/ml) et dB sa variation par intervalle de temps dt.

A partir de cette équation, la concentration minimale inhibitrice théorique (Austin, 1998) peut être calculée par la formule suivante :  $C_{mic} = EC_{50} \cdot \frac{E_{max} - g}{g}$

La plupart des effets antibiotiques précédemment décrits peuvent être modélisés par cette équation, les paramètres g, Emax et n variant en fonction du mode d'action.

Pour les antibiotiques dits concentration-dépendants, l'amplitude de la courbe de réponse permet un accroissement de l'effet avec l'augmentation de la concentration. Ceci se traduit par des concentrations minimales bactéricides éloignées de la CMI. Ces antibiotiques se caractérisent par une valeur d'Emax plus importante que la croissance maximale g et par une valeur d'indice de sigmoïdité inférieure à 1.

Pour les antibiotiques dits temps-dépendants, l'augmentation de la concentration ne permet pas un accroissement de l'effet bactéricide. Ceci se

traduit par une valeur de CMB proche de la valeur de CMI. On peut distinguer cependant le cas des antibiotiques bactéricides ayant un  $E_{max}$  très supérieur à la vitesse de croissance, des antibiotiques dits bactériostatiques ayant un  $E_{max}$  de l'ordre de 2 fois la vitesse de croissance.

Dans certains cas, l'effet de l'antibiotique sur certaines souches est uniquement de stopper la croissance bactérienne sans induire de mortalité à fortes concentrations, on parle dans ce cas de bactéries tolérantes. Celles-ci ne seront pas facilement détectées par les tests statiques classiques mais uniquement par l'analyse des mesures de CMB ou les cinétiques de bactéricidie.

La relation entre l'effet d'un antibiotique et la concentration suit une relation non linéaire dont les paramètres sont différents selon les antibiotiques. Deux antibiotiques différents, ayant pour un germe donné, une CMI identique peuvent donc avoir des effets pharmacodynamiques très différents à des concentrations sub- et supra-inhibitrices. Lorsque l'on compare les paramètres pharmacodynamiques d'un antibiotique sur différentes souches d'une espèce bactérienne ayant les mêmes CMI, on peut également observer des profils pharmacodynamiques différents.

### **1.3. Approche pharmacocinetique-pharmacodynamique pk/pd**

L'utilisation de paramètres, dits PK/PD pour décrire, prédire et comprendre les relations entre le déroulement d'un traitement et son efficacité au plan clinique et bactériologique, s'est développée depuis une vingtaine d'années (Schentag et al., 1985). La mesure de l'efficacité d'un traitement antibiotique ne se mesure pas uniquement par la guérison clinique mais également par l'élimination de la bactérie du site d'infection. En effet, si l'élimination de la bactérie n'est pas obtenue à la fin du traitement, une population plus résistante peut devenir prédominante (Dagan et al., 2001) créant un risque de rechute chez le sujet traité mais aussi un risque de dissémination de souches résistantes vers d'autres sujets. En fonction des maladies provoquées par des bactéries, il est important de déterminer si le succès clinique est seul suffisant, ou s'il est nécessaire de définir des critères de cures bactériologiques.

La relation entre les traitements antibiotiques et l'élimination des bactéries peut être étudié par différents types de modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* sur des animaux de laboratoire. Ces modèles sont utilisés pour étudier la relation entre des paramètres pharmacocinétiques (AUC,  $C_{max}$ ) ou des paramètres PK/PD et les résultats cliniques et bactériologiques. La limite principale des modèles *in vitro* ou de certains modèles *in vivo* est qu'ils ne tiennent pas compte de la réponse du système immunitaire (pour de nombreux essais *in vivo* menés sur les rongeurs, le système immunitaire est invalidé pour mieux mettre en évidence l'action propre de l'antibiotique).

Les principaux paramètres PK/PD utilisés sont le temps de maintien d'une concentration supérieure à la CMI ( $T > CMI$ ), le rapport de la concentration maximale par rapport à la CMI ( $C_{max}/CMI$ ) et le rapport de l'aire sous la courbe par la CMI ( $AUC/CMI$ ) ou l'aire sous la courbe au dessus de la CMI (AUIC).

Les études réalisées avec les bêta-lactamines dans les modèles animaux expérimentaux ont montré que le maintien d'une concentration supérieure à la CMI pendant plus de 40 % des intervalles de dosage permettait une cure bactériologique dans 85 à 100 % des cas (**Craig, 1998**). Pour les fluoroquinolones des rapports  $AUC/CMI$  inférieurs à 30 h sont associés à une mortalité de plus de 50 % tandis que des valeurs supérieures à 100 h ne sont pas associées à de la mortalité (Craig, 1998). Chez l'homme, pour la ciprofloxacine administrée par voie intraveineuse, des valeurs d' $AUC/CMI$  supérieures à 125 h correspondent à une amélioration clinique satisfaisante chez des sujets sévèrement malades (Forrest et al., 1993).

Pour les aminoglycosides, le rapport  $AUC/CMI$  sur 24 h est un bon prédicteur dans les modèles expérimentaux (Craig, 1998) tandis que la réponse clinique est corrélée au ratio  $C_{max}/C_{mi}$  dans les essais cliniques (**Moore et al., 1984**) avec plus de 90 % de guérison dès que le rapport est de 8 à 10. Pour cette classe d'antibiotiques, où une résistance adaptative, phénotypique et réversible, s'installe (**Daikos et al., 1991**), le maintien d'une concentration élevée n'est pas recommandée. De plus, l'utilisation d'une administration quotidienne réduit le risque de néphrotoxicité et d'oto-toxicité.

L'étude de la relation entre les paramètres PK/PD et le développement de la résistance ont fait l'objet de nombreux travaux avec les fluoroquinolones. Cette voie de recherche a étudié la relation entre la probabilité d'émergence de mutants résistants au site de l'infection. De fortes valeurs du ratio  $C_{max}/CMI$  ou d' $AUIC$  réduisent le risque de sélection de mutants résistants. Cependant des valeurs moyennes, prédictives d'une bonne efficacité sur les souches sensibles peuvent accroître le risque de mutants résistants selon les travaux expérimentaux de Firsov (**Firsov et al., 2003**).

Chez l'homme, l'intérêt de cette approche a été vérifiée dans le cadre des infections respiratoires. Cependant, la nature du germe infectieux doit être prise en compte puisque les résultats diffèrent selon la nature de la bactérie et des mécanismes de résistance (Thomas et al., 1998). En effet, cette relation n'est pas démontrée pour le traitement par les bêtalactamines d'espèces bactériennes capables de produire des bêta-lactamases de type I. En médecine humaine, les résultats obtenus avec ce type d'approche méthodologique sont dus à la possibilité de réaliser une individualisation des posologies au chevet du patient (Schentag et al., 1985) et peuvent être utiles dans l'élaboration de politique d'utilisation à l'hôpital. Récemment,

l'utilisation de ces approches a été proposée pour établir les concentrations critiques en se basant sur la connaissance des variations individuelles en termes de pharmacocinétique et de la distribution des CMI des germes visés (Ambrose et al., 2000). L'utilisation de la démarche PK/PD a également fait l'objet de travaux en médecine vétérinaire à l'aide de modèles expérimentaux chez l'animal de destination (Renard et al., 1996; Aliabadi et al., 2003; Greko et al., 2003), ou durant une infection expérimentale (Renard et al., 1996). L'élaboration de concentrations critiques, ayant une valeur en termes d'efficacité thérapeutique a été proposée pour tenir compte de la variabilité des expositions individuelles en thérapeutique vétérinaire (Toutain, 2003).

## **2. Les mécanismes microbiologiques de la résistance**

### 2.1. Définitions de la résistance

La résistance aux antibiotiques peut être définie selon différents points de vue.

- 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 concentration minimale inhibitrice.
- Pour le microbiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice.
- Pour l'épidémiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle a une concentration minimale inhibitrice significativement différente de celles de la population normale.

Afin de classer les bactéries en catégories sensible, intermédiaire ou résistante, des seuils critiques, « breakpoints », sont déterminés par des groupes d'experts sur la base des informations cliniques, pharmacologiques, microbiologiques et épidémiologiques. Ces seuils critiques sont donnés pour des méthodes standardisées de détermination de la concentration minimale inhibitrice (concentration critique) ou de mesure de diamètres d'inhibition par une méthode de diffusion (diamètre critique). En France, ces seuils critiques sont définis périodiquement par le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) ; ils sont définis par des approches comparables dans d'autres pays tels que les travaux du National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS<sup>12</sup>) aux Etats-Unis, le Deutsche Institut für Normung (DIN) en Allemagne. Les valeurs de ces seuils peuvent varier d'une norme à l'autre, selon l'expertise réalisée. En Europe, un travail de standardisation est en cours sous l'égide de l'EUCAST (European Union Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing).

12

Nommé désormais Clinical Laboratory Standard Institut (CLSI)

Les définitions du CA-SFM (2004) sont les suivantes pour les trois catégories cliniques retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (« S »), Résistant (« R ») et Intermédiaire (« I »).

Les souches catégorisées « S » sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP).

Les souches catégorisées R 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 « I » 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 présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie « S ». Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement ;
- peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie « R », et suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions d'utilisation (fortes concentrations locales ou posologies accrues) définies pour le produit approuvé par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afssaps).

Une espèce bactérienne sera définie comme naturellement résistante lorsque les valeurs de CMI mesurées dans un ensemble de souches sont supérieures aux concentrations sanguines normalement atteintes chez l'homme.

Une espèce bactérienne sera définie comme sensible si les valeurs de CMI mesurées chez la majorité des souches sont inférieures aux concentrations sanguines atteintes chez l'homme pendant un traitement.

La notion de résistance est donc relative à la technique utilisée et aux modalités d'interprétation. Ceci explique la variation des valeurs critiques en fonction des référentiels nationaux (National Committee of Clinical Laboratory Standards, NCCLS, Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, CA-SFM, British society of antimicrobial chemotherapy, BASC, Deutsches Institut für Normung, DIN) (Gnanou et al., 2000). En médecine humaine, une démarche d'harmonisation européenne est en cours sous la responsabilité de l'ESCMID (European society of clinical microbiology and infectious diseases).



On applique également les définitions suivantes pour les différentes espèces bactériennes en fonction de leur sensibilité à l'antibiotique :

- espèce habituellement sensible : espèce appartenant au spectre naturel de l'antibiotique et pour laquelle, la résistance acquise concerne moins de 10% des souches isolées en clinique,
- espèce inconstamment sensible : espèce pour laquelle la résistance acquise dépasse 10% des souches isolées en clinique,
- espèce résistante : espèce pour laquelle plus de 50% des souches sont résistantes à l'antibiotique ou à la famille de l'antibiotique.

Dans la ligne directrice de rédaction du résumé des caractéristiques du produit, l'agence européenne d'évaluation du médicament et les agences nationales se basent sur les informations décrivant la sensibilité des espèces bactériennes pour chaque antibiotique et utilisent les définitions suivantes.

La catégorie sensible inclut les espèces bactériennes naturellement sensibles avec leur pourcentage de résistance acquise à cet antibiotique.

La catégorie « modérément sensible » inclut les espèces bactériennes qui présentent une sensibilité intermédiaire à l'antibiotique (ex : entérocoque et pénicilline G) ;

La catégorie résistante inclut les espèces bactériennes naturellement résistantes et celles chez lesquelles le taux de résistance est élevé (ex : *S. aureus* et *Moraxella catarrhalis* et pénicilline G) (Cornaglia et al., 2004).

#### A retenir

La définition de la résistance aux antibiotiques est fonction de différents points de vue (clinicien, pharmacologue, bactériologiste, épidémiologiste). La classification des bactéries en sensible, intermédiaire ou résistante évolue en fonction de l'acquisition des connaissances et doit être comprise selon le contexte de son utilisation pour des raisons de diagnostics, de définition des conditions d'utilisation des médicaments ou de surveillance épidémiologique. Deux notions de la résistance acquise sont aujourd'hui définies. La première concerne le phénotype de résistance acquise mise en évidence au laboratoire par rapport à la population des souches sauvages sensibles. Elle se définit par rapport à une valeur seuil « Breakpoint » épidémiologique. La seconde est celle définie d'un point de vue clinique et pharmacologique comme une concentration minimale inhibitrice ne permettant pas d'atteindre chez la majorité des patients, des valeurs seuils de critères pharmacologiques prédisant le succès clinique et bactériologique. Les travaux menés dans ce domaine en médecine vétérinaire sont rares.

## 2.2. Mécanismes bactériens de la résistance

Les mécanismes de résistance sont variés, mais on peut les classer en trois catégories principales (Tableau 12).

Tableau 12 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Catégories	Mécanismes	Familles concernées
Inaccessibilité à la cible "blindage"	Système actif d'efflux hors de la cellule	Tétracyclines, macrolides, phénicolés, quinolones, bêta-lactamines
	Diminution de la perméabilité	Phénicolés, tétracyclines
Inactivation	Inactivation enzymatique de l'antibiotique	bêta-lactamases, estérases (macrolides), phosphorylases (aminosides, macrolides), acétyltransférases (chloramphénicol)
Esquive ou camouflage	Modification /protection de la cible (par mutation ou voie enzymatique) Court circuit de voie métabolique utilisée	Triméthoprim-sulfamides, tétracyclines, macrolides, bêta-lactamines, fluoroquinolones ...

### Résistance naturelle

Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes sur lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. On parle d'espèces bactériennes naturellement résistantes et de mécanismes de résistance intrinsèques. Ceci peut être dû à l'absence de la cible (comme l'absence de paroi chez les mycoplasmes les rendant insensibles aux bêta-lactamines) ou encore à l'absence de pénétration de l'antibiotique (rôle de la membrane externe par exemple chez les bactéries Gram négatifs avec la vancomycine).

### Résistance acquise

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un antibiotique. Cette acquisition peut être liée à une (des) mutation(s) modifiant la cible de l'antibiotique, ou un schéma métabolique (Chopra, 2003). Cette acquisition peut être la conséquence d'un transfert horizontal, y compris entre espèces éloignées phylogéniquement. Les gènes de résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes producteurs (et par lesquels ils résistent à leurs propres produits) sont généralement localisés sur le chromosome. Le transfert de ces gènes sera rendu plus efficace après leur intégration sur des éléments mobiles

tels que plasmides, transposons, intégrons (Rowemagnus, 2001) ou encore sur des phages. Ces mécanismes de résistance peuvent alors diffuser très rapidement dans une population (Licht, 1999).

Les mécanismes de transfert (Figure 9) correspondent à des mécanismes bien connus : transformation (à partir d'ADN nu, notamment dans l'écosystème du sol), conjugaison (à partir de plasmides), transduction (à partir de phages).

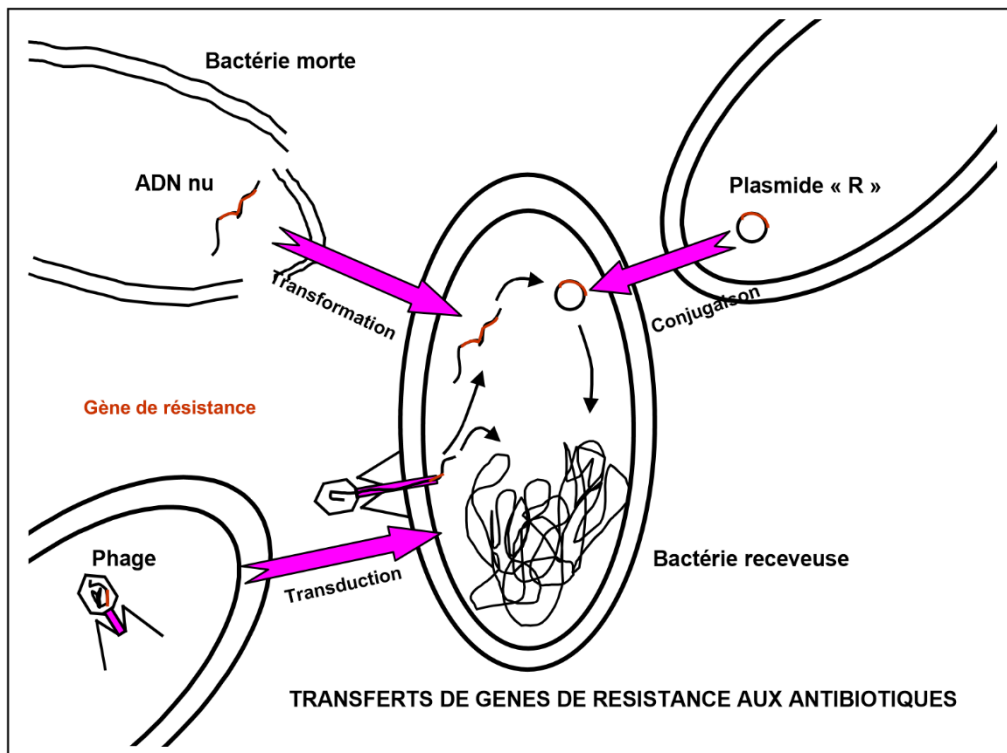


Figure 9 : Mécanismes de transferts des gènes de résistance

Un gène peut coder pour un mécanisme de résistance aux antibiotiques. On parle de résistance croisée quand la résistance conférée par ce seul gène de résistance concerne plusieurs molécules appartenant à la même famille ou à des familles différentes. Par exemple, la résistance à la méticilline des staphylocoques due à la production d'une nouvelles protéine liant les pénicillines (PLP2a) est une résistance croisée envers toutes les molécules appartenant à la famille des bêta-lactamines. Un autre exemple est la résistance due à un système d'efflux qui va conférer une résistance croisée

entre des molécules antibiotiques de différentes familles, toutes substrats pour la pompe d'efflux.

Quand plusieurs gènes de résistance à différentes molécules ou familles d'antibiotiques s'associent au sein d'une structure génétique tel qu'un transposon, un plasmide ou un intégron, on parle alors de co-résistance aux antibiotiques. Quand ces résistances sont transférables, elles sont généralement transférées en bloc.

L'utilisation d'un des antibiotiques pour lequel la bactérie est résistante sélectionnera en même temps, les autres gènes de résistance. Ce phénomène est appelé co-sélection. Les gènes associés dans ces structures peuvent concerner la résistance aux antibiotiques mais aussi d'autres mécanismes tels que la résistance aux métaux lourds ou l'adaptation à certains milieux particuliers. Des conditions, autres que les traitements antibiotiques peuvent être, dès lors, sélectionnantes (Petkewich, 2002) dans certains environnements tels que les sols pollués ou les rivières.

### **3. Ecologie microbienne**

La compréhension des mécanismes de sélection, puis de transmission de la résistance aux antibiotiques est basée sur une approche écologique qui tient compte des capacités d'adaptation des souches bactériennes à des variations de leur environnement proche, de la richesse et de la diversité des populations bactériennes dans différents types d'environnements (animaux, lisiers, litières, sols, eaux, etc.), des modalités d'échanges de gènes entre ces populations bactériennes et la survie des différentes espèces bactériennes dans les différents environnements rencontrés. On distingue les notions de fenêtres et de compartiment de sélection.

#### **3.1. Fenêtre de sélection**

Lorsque des souches présentes dans un même milieu contenant un antibiotique ont des sensibilités différentes, un domaine de concentrations va favoriser la multiplication d'une souche par rapport à une autre (Lipsitch et al., 1997).

Il faut tenir compte à la fois de l'avantage donné en termes de croissance positive ou pour la phase de décroissance en termes de différence de vitesse de réduction des populations. La largeur de cette fenêtre de sélection par rapport à la différence des CMI des deux souches est plus ou moins large en fonction de l'indice de sigmoïdité et de l'amplitude de l'effet bactéricide.

Si les concentrations varient au cours du temps, la période pendant laquelle les concentrations locales sont contenues dans le domaine de concentrations sélectionnantes délimite une fenêtre de sélection.

Compte tenu des variations pharmacocinétiques, la taille des fenêtres de sélection varie entre les sites d'action. Du fait de la variabilité individuelle,

les fenêtres de sélection varient également entre les animaux et sont fonction des bactéries présentes dans les différents sites d'action.

Au cours d'un traitement, les souches d'espèces bactériennes naturellement résistantes ou de sensibilité réduite à l'antibiotique seront favorisées par rapport à des souches sensibles durant les fenêtres de sélection existant dans différents sites d'action. Ce phénomène contribuera à l'enrichissement de l'écosystème par des bactéries résistantes. Si la résistance apparaît par mutation, les souches mutantes, résistantes à l'antibiotique, pré-existantes avant traitement, au sein de la population bactérienne, seront favorisées. De même, les bactéries ayant une résistance acquise transférable, seront favorisées et dans certains cas, le taux de transfert vers les bactéries sensibles sera augmenté.

La capacité d'enrichissement au cours d'une fenêtre de sélection dans un environnement donné est donc également fonction des populations initiales sensibles et résistantes et du mode d'acquisition de la résistance. Dans le cas d'une acquisition par mutation, le nombre de mutants résistants apparaissant au cours de la fenêtre est fonction de la taille de la population sensible présente. Dans le cas d'acquisition par transfert d'éléments génétiques, l'accroissement du nombre de bactéries résistantes est fonction de la taille initiale des populations de souches donneuses et réceptrices et du mécanisme de transfert (transformation, conjugaison). Ce taux de transfert est fonction des conditions de viabilité des souches, de leur capacité à recevoir et donner et dans de nombreux cas est influencé par la densité bactérienne et la présence d'antibiotique.

Ces phénomènes de sélection contribuent à l'émergence de bactéries résistantes au sein de populations d'animaux traités mais également dans leur environnement proche (litière, etc.) et dans les lisiers émis par ces animaux qui contiendront l'antibiotique et ses métabolites actifs.

### **3.2. Compartiment de sélection**

Les flores intestinales de l'homme et des animaux sont un environnement privilégié en termes de compartiment de sélection et d'amplification des bactéries résistantes et des gènes de résistance. D'autres flores présentes sur les sujets traités sont également exposées au traitement antibiotique.

Lors de leur utilisation, les antibiotiques pourront contaminer l'environnement (poussière, eau d'abreuvement) et après traitement se retrouveront dans les excréments des animaux puis dans l'environnement (sols, eaux). Ils pourront également contaminer les denrées alimentaires sous forme de résidus. Flore intestinale

Chez l'homme, la flore intestinale avec ses  $10^{14}$  micro-organismes forme un écosystème complexe dont la composition varie en fonction de la localisation

dans le tube digestif et en fonction de l'individu. L'estomac, le duodénum et l'intestin grêle proximal contiennent peu de bactéries ( $10^3$ - $10^4$  bactéries/ml) pour la plupart des lactobacilles et des streptocoques. Le colon abrite la densité microbienne la plus forte avec  $10^9$ - $10^{11}$  bactéries/ml et une majorité de bactéries anaérobies strictes, composées de 400 à 500 espèces différentes (Khan et al., 2001). A côté de cette flore résidente, il peut exister chez certains individus, ou chez un même individu mais de façon inconstante, une flore dite allochtone ou transitoire, qui sauf circonstances pathologiques, ne s'implante pas dans le tube digestif. Les différentes techniques d'étude de la flore intestinale telles que la microbiologie classique, la biologie moléculaire, les modèles animaux à flore contrôlée ou les modèles *in vitro*, ont permis de mieux comprendre l'écosystème bactérien, ses interactions avec l'hôte et son rôle.

Chez les animaux, l'anatomie du tube digestif et les flores intestinales qui y résident, sont variables d'une espèce animale à l'autre et comme chez l'homme, varient en fonction des stades physiologiques et de l'alimentation. La flore intestinale est un des principaux compartiments où les phénomènes de sélection de bactéries résistantes peuvent se dérouler.

La flore établit des relations multiples avec l'hôte, créant un équilibre dynamique dont la stabilité est maintenue par des interactions partiellement connues. L'acidité gastrique, le péristaltisme intestinal, le système immunitaire participent à cette stabilité. Mais cet écosystème est constamment sollicité par le milieu extérieur, qu'il s'agisse de bactéries exogènes ou de substances alimentaires. Pour se défendre de ces agressions, les bactéries de la flore intestinale assurent un rôle de barrière en s'opposant à l'implantation et à la multiplication des micro-organismes d'origine exogène. Cette résistance à la colonisation est principalement assurée par la flore anaérobie. L'effet drastique de cette barrière provoque une élimination rapide d'une souche exogène tandis qu'un effet permissif permet à une souche exogène de se maintenir, parfois très longtemps, mais à un niveau de population tel qu'elle ne peut s'y développer. Les mécanismes de résistance à la colonisation sont encore mal connus mais font probablement intervenir une compétition entre les micro-organismes pour des substrats tels que les constituants alimentaires ou les mucines, des sites d'adhésion sur la muqueuse intestinale ou encore la production de substances inhibitrices comme les bactériocines ou d'autres impliquées dans les phénomènes de « quorum sensing » (Sperandio et al., 2003). Cet équilibre peut être perturbé par les antibiotiques, le stress, les opérations chirurgicales ou encore par un

défaut du système immunitaire. Dans le cas d'une antibiothérapie, la fraction de la dose administrée qui est excrétée sous forme active par voie biliaire ou sécrétée par la muqueuse intestinale, à laquelle s'ajoute en cas d'administration orale la fraction non absorbée, peut suffire à altérer l'équilibre écologique microbien de la flore intestinale. Les effets observés chez l'hôte peuvent être alors (Corpet, 1993; Cerniglia et al., 1999; Khan et al., 2001) :

- i) l'élimination des bactéries sensibles aux concentrations actives de l'antibiotique, ii) la sélection et la prolifération de bactéries résistantes au sein de la flore endogène,
- iii) la colonisation du tractus digestif par des micro-organismes exogènes résistants, en particulier ceux apportés par l'alimentation et
- iv) la translocation bactérienne (passage de bactéries de la lumière intestinale aux ganglions mésentériques et éventuellement à d'autres organes). Ces microorganismes peuvent être responsables d'infections graves.

Chez l'homme, les colites pseudomembraneuses, liées au développement de *Clostridium difficile* producteur de toxines, sont l'illustration de l'effet des antibiotiques sur la flore intestinale. La prise d'antibiotiques est un facteur de risque de survenue d'une infection à salmonelles (Dore et al., 2004). De même chez le lapin, des colites consécutives à l'utilisation de clindamycine ont été décrites et résultent de la production de iota-toxines par *Clostridium spiroforme* (Borriello et al., 1983; Paddenberg et al., 1998). Inversement Collier et al. (Collier et al., 2003) montrent que l'administration de tylosine permet de réduire les bactéries mucolytiques et la colonisation par *Clostridium perfringens* chez le poussin, entraînant ainsi une diminution des lésions d'entérite nécrotique

Plusieurs facteurs interviennent sur l'intensité des modifications de l'écosystème intestinal au cours d'un traitement antibiotique donné, notamment la concentration d'antibiotique qui atteint la lumière intestinale, l'activité intrinsèque de la molécule sur les bactéries qui composent l'écosystème, de sa fixation à des composants du bol alimentaire (protéines, cellulose,...) et son inactivation éventuelle dans le contenu intestinal. En effet, les concentrations d'antibiotiques présentes dans la lumière intestinale sont notablement différentes des concentrations sériques qui servent à définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes d'un point de vue thérapeutique, ce qui donne lieu à l'observation d'effets apparemment paradoxaux de certains antibiotiques sur l'écosystème intestinal. Par exemple, chez le jeune enfant, l'érythromycine administrée *per os* entraîne l'élimination des populations d'entérobactéries car les concentrations atteintes

dans la lumière intestinale dépassent largement les concentrations minimales inhibitrices pour ces bactéries (Butel et al., 1986).

Lorsque le traitement antibiotique a permis la sélection ou le développement de bactéries résistantes, le transfert et la dissémination du gène de résistance à l'antibiotique considéré augmente. Ces échanges peuvent survenir entre souches résidentes de la flore intestinale, de façon spontanée, même en l'absence de l'antibiotique, entre espèces identiques, différentes, voire éloignées. Par exemple, certains gènes de résistance sont présents à la fois chez des Gram+ et des Gram- appartenant au même écosystème intestinal. Les gènes *tetM* et *ermB* ont pour hôte originel les cocci Gram+ et sont pourtant retrouvés chez des Gram- appartenant au tube digestif. L'amplification du nombre de copies d'un gène de résistance porté par une bactérie commensale peut être considérable puisque ce gène peut être transféré verticalement (à la descendance) ou horizontalement (aux autres lignées bactériennes).

En conclusion, l'écosystème intestinal, avec le système immunitaire, participe aux défenses de l'hôte contre les agressions microbiennes. Les antibiotiques sont une cause majeure de perturbation de cet équilibre qui peut devenir alors une voie d'entrée à des bactéries potentiellement pathogènes. La flore intestinale étant un réservoir important de gènes de résistance, contrôler l'utilisation des antibiotiques est nécessaire pour prévenir la dissémination de ces gènes.

Autres flores commensales

Sur les animaux et l'homme, les autres flores commensales sont la flore cutanée, la flore oro-pharyngée, la flore vaginale, etc. Ces flores bactériennes sont moins denses que la flore intestinale et ont été moins étudiées du point de vue des conditions de sélection de la résistance aux antibiotiques. Mais les mécanismes généraux de sélection et d'amplification de la résistance y sont comparables à ceux mis en œuvre dans la flore intestinale.

La capacité de résidence des bactéries pathogènes au sein de ces flores est importante à connaître pour évaluer les risques de sélection et de transfert de gènes de résistance par rapport aux bactéries pathogènes.

4. Mesure de la résistance

#### **4.1. Méthodologie de l'antibiogramme**

Définitions

L'antibiogramme est conçu pour prédire la sensibilité des bactéries aux antibiotiques en termes d'efficacité clinique. Il permet de catégoriser une souche pathogène en catégories cliniques sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) et non en classes thérapeutiques comme « modérément sensible



». L'antibiogramme sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne, et peut orienter l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles. Méthodes

L'antibiogramme a pour but de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques. Différentes techniques sont utilisées pour apprécier cette valeur.

#### *Méthodes de dilution*

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2.

En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macro-dilution) ou de cupules (méthode de micro-dilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.

La méthode de dilution en milieu gélosé est la méthode de référence pour la mesure de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques et elle est habituellement utilisée pour évaluer l'activité d'un anti-infectieux donné sur une ou plusieurs souches bactériennes.

Cette méthode est réalisée en incorporant l'antibiotique dans un milieu gélosé. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.

#### *Méthode de diffusion*

La méthode de diffusion en milieu gélosé consiste à évaluer simultanément l'activité inhibitrice de plusieurs anti-infectieux représentatifs des principales familles d'antibiotiques sur une souche bactérienne en mesurant les diamètres d'inhibition autour de disques chargés en antibiotique.

Lorsque l'on dépose à la surface de la gélose, un disque de papier buvard imprégné d'un anti-infectieux, celui-ci diffuse au sein de la gélose en créant un gradient de concentration décroissant au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque. Si, avant de déposer le disque, on aensemencé en nappe la surface d'un milieu gélosé avec une culture bactérienne pure sensible à cet anti-infectieux, après incubation, la culture est inhibée autour du disque. La zone

d'inhibition est circulaire et centrée sur le disque. Le diamètre suit une loi inverse à la valeur de la CMI.

A la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations d'antibiotiques égales aux CMI. La méthode de diffusion ne permet pas de chiffrer directement ces valeurs. Il existe cependant une relation entre les diamètres des zones d'inhibition et les log base 2 des CMI mesurées par les techniques de dilution. Ces relations appelées droites de concordance ou de régression sont établies dans les conditions standard pour chaque type de disque dont la charge en anti-infectieux est parfaitement définie.

#### *Autres méthodes*

Technique en milieu gélosé : le Etest<sup>®</sup>

Le Etest<sup>®</sup> (AES) permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Le Etest<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture, imprimée sur la bandelette, permet une interprétation rapide.

#### Antibiogramme automatisé

Ce terme est utilisé pour désigner les appareils effectuant la lecture et l'interprétation des tests faits manuellement. Ces appareils fonctionnent selon deux grands principes :

- ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques,
- ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques.

Les systèmes étudient la croissance bactérienne soit en présence d'une seule concentration d'antibiotique (concentration permettant de discriminer les bactéries sensibles des bactéries résistantes) soit en effectuant une analyse cinétique de la croissance (exemples : système ATBExpression (Biomérieux), Vitek 2 (Biomérieux), Phoenix (Becton Dickinson).

#### Standardisation

La fiabilité des résultats est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être contrôlés. Les recommandations techniques sont émises par différents comités d'experts, en France par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Les laboratoires doivent organiser un contrôle de qualité interne et participer à des contrôles de qualité externe.

### Expression des résultats

Les laboratoires disposent généralement des diamètres ou des concentrations minimales inhibitrices qui sont les données brutes de l'antibiogramme. Ces données sont interprétées par rapport aux seuils critiques pour chaque antibiotique.

Si le diamètre mesuré est inférieur au diamètre critique inférieur ou si la concentration obtenue est supérieure à la concentration critique supérieure, la souche est résistante.

Si le diamètre mesuré est supérieur ou égal au diamètre correspondant au seuil critique supérieur ou si la concentration obtenue est inférieure ou égale à la concentration critique inférieure, la souche est sensible.

Si le diamètre est compris entre les deux valeurs, la souche est considérée comme intermédiaire.

Ces règles d'interprétation ne sont applicables que si les recommandations suivies sont celles du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Cependant cette catégorisation n'est pas suffisante et il convient de réaliser une lecture interprétative qui permet de détecter les phénotypes et mécanismes de résistance connus ou nouveaux (communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie<sup>13</sup>). La réponse ainsi interprétée, en ce qui concerne les mécanismes de résistance, sera ensuite confrontée aux données cliniques et aux données pharmacologiques.

Cette lecture interprétative nécessite quelques règles notamment pour la disposition des disques imprégnés d'antibiotique les uns par rapport aux autres.

C'est le cas dans le cadre de la recherche de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Ces bêta-lactamases sont des pénicillinases qui inactivent toutes les bêta-lactamines (à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes) ; elles sont inhibées par l'acide clavulanique. Leur recherche repose donc sur la mise en évidence d'une synergie entre une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (ceftazidime) ou l'aztréonam et l'inhibiteur de bêtalactamase, l'acide clavulanique. Le test consiste à placer un disque contenant l'association amoxicilline/acide clavulanique à 3 cm des disques des bêta-lactamines désignées ci-dessus et à observer la synergie éventuelle qui confirme la production de BLSE. Dans le cas de la détection d'une BLSE et de mise en évidence d'une synergie, il est nécessaire d'interpréter « I », tout résultat « S » obtenu pour le céfotaxime, le ceftriaxone, la ceftazidime, le céfépime, l'aztréonam et pour le ceftiofur et la cefquinome dans le cas d'un antibiogramme réalisé en médecine vétérinaire.

## **4.2. Méthodologie moléculaire**

### Détection de gènes de résistance

La résistance aux antibiotiques peut être due à une absence de la cible de l'antibiotique, à l'acquisition de gènes de résistance ou alors à la modification génétique de gènes du métabolisme, régulant la perméabilité ou l'efflux. Différents outils moléculaires sont

13

[http://www.sfm.asso.fr/nouv/gen\\_eral.php?pa=2](http://www.sfm.asso.fr/nouv/gen_eral.php?pa=2)

actuellement utilisés pour la détection et la caractérisation des gènes et des mutations impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Ces gènes de résistance aux antibiotiques sont situés soit sur des structures auto-répliquatives autonomes (de type plasmides), soit sur le chromosome. Ils peuvent être intégrés dans des éléments génétiques mobiles (de type transposon, intégron, îlot génomique).

La méthode de choix, utilisée à la fois pour la détection des gènes de résistance et pour la mise en évidence de mutations est la PCR (Polymerase Chain Reaction).

La PCR est utilisée pour mettre en évidence un gène responsable d'un phénotype de résistance mais également pour estimer la prévalence des gènes de résistance dans une population bactérienne. Cette technique peut permettre ainsi d'identifier une résistance « unique » mais également l'organisation de gènes par rapport à d'autres gènes. Ce type

d'approche a été utilisé pour déterminer l'organisation, au niveau du locus de multirésistance, des gènes conférant la pentarésistance chez *Salmonella* Typhimurium de lysotype DT104 (Arcangioli et al., 1999a). La PCR peut être combinée à une restriction enzymatique dans le cadre de la détection de mutations conférant une résistance aux antibiotiques. En effet, il se peut que de telles mutations puissent créer ou modifier les sites de reconnaissance des endonucléases. La détection de mutations est également réalisée en utilisant des oligonucléotides spécifiques. Une Mismatch Amplification Mutation Assay PCR (MAMA PCR) est ainsi utilisée pour la détection de la mutation dans le gène *gyrA* conférant la résistance aux quinolones chez *C. coli* et *C. jejuni* (Zirnstein et al., 1999; Zirnstein et al., 2000).

La localisation génétique des gènes sur des structures mobiles ou sur le chromosome peut être étudiée par PCR. Grâce à la présence de séquences conservées au niveau des intégrons, la présence de gènes de résistance sur ces structures peut être confirmée

(Levesque et al., 1995). De même, la détection de transposons est réalisée grâce à cette technique.

L'hybridation ADN-ADN est également utilisée pour la détection de gènes de résistance. Cette technique plus lourde à mettre en place que la PCR permet grâce à des sondes internes de confirmer la présence de gènes, ou l'organisation de gènes.

#### Epidémiologie moléculaire

Les méthodes moléculaires se sont beaucoup développées ces dernières années notamment pour l'investigation épidémiologique et la comparaison de souches bactériennes. Ces méthodes permettent également d'apprécier la diffusion d'un clone au sein d'une population donnée ou bien de mettre en évidence des transferts horizontaux de gènes et sont donc bien adaptées au suivi de la diffusion de gènes de résistance portés sur des structures mobiles telles que les plasmides ou intégrons par exemple. De nombreuses méthodes ont été décrites, certaines sont basées uniquement sur l'analyse de plasmides, d'autres s'intéressent à l'ensemble du génome bactérien que ce soit spécifiquement pour l'identification de certaines régions de l'ADN chromosomique ou de façon plus générale pour l'analyse de fragments représentatifs de l'ensemble du génome. Le pouvoir de discrimination des souches est variable selon les méthodes et l'espèce bactérienne analysées.

Schématiquement, les méthodes reposent sur deux grands principes :

- soit l'amplification par PCR de séquences données telles que Random Amplified

DNA polymorphism (RAPD), Repetitive Element Polymorphism (REP-PCR), IS-PCR,

- soit la restriction de l'ADN bactérien suivie ou non d'une hybridation de certains fragments, c'est le cas de la ribotypie qui met en évidence les ADN codant pour les ARNs ribosomaux, de toutes les technique de type RFLP suivie d'une révélation de fragments ciblés, ou de l'électrophorèse en champ pulsé après macrorestriction de l'ADN (PFGE). Certaines méthodes font appel à la combinaison des deux principes, c'est le cas de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), d'autres plus récentes encore utilisent la méthode de séquençage sur de régions définies, c'est le cas de la technique MLST (Multi Locus Sequence Typing).

Ces différentes techniques sont parfaitement adaptées à l'investigation épidémiologique et les critères de choix tiennent compte de leur performance

en termes de pouvoir de discrimination, de reproductibilité, de standardisation et de facilité de mise en œuvre au laboratoire. Ces méthodes moléculaires permettent à la fois de caractériser les gènes de résistance et d'analyser le génome bactérien. La combinaison de ces deux applications permet de différencier la diffusion horizontale de résistance aux antibiotiques de celle impliquant une dissémination clonale. Dans la plupart des cas, la diffusion horizontale d'un ou de plusieurs gènes de résistance plasmidiques ou chromosomiques est marquée par la présence de profils moléculaires ou génotypes différents des isolats testés portant le support de résistance. C'est le cas, par exemple, de la résistance au florfénicol de type plasmidique chez *E. coli*. Au contraire, lors d'une diffusion clonale de la résistance, les profils moléculaires des souches hébergeant cette résistance sont identiques, c'est ce qui a été observé, en 1998, par Ridley et Threlfall (Ridley et al., 1998a) dans le cas de la pentarésistance de type ACSSuT codée par un cluster de gènes chromosomiques chez *S. Typhimurium* de lysotype DT104, néanmoins, d'autres travaux ont pu mettre en évidence la présence de cette structure pour d'autres lysotypes et même d'autres sérotypes chez *Salmonella*, laissant ainsi supposer qu'il existe également un transfert horizontal de ces gènes. Les méthodes moléculaires ont pu ainsi mettre en évidence l'implication des intégrons, dans les transferts horizontaux de cluster de gènes et par conséquent dans la diffusion de souches multi-résistantes. D'autres méthodes moléculaires sont actuellement en cours de développement, elles font appel à la technologie de PCR en temps réel permettant la détection rapide et sensible de gènes de résistance, ou à la technologie de puces à ADN qui permet la mise en évidence simultanément de mutations et de nombreuses séquences génomiques, en particulier celles codant pour les résistances à différentes familles d'antibiotiques.

### **4.3. Méthodologie épidémiologique**

Au plan épidémiologique, on distingue la surveillance, des études ciblées ponctuelles (enquêtes).

#### Programme de surveillance

La surveillance consiste en un recueil et une analyse systématique et durable de données, faisant l'objet d'un retour vers ceux qui les ont générées, utilisées pour la planification, la mise en place et le suivi de politique de santé publique.

La surveillance de la résistance est une activité primordiale d'un programme de lutte contre le développement de la résistance et le succès d'une surveillance européenne dépend de l'efficacité des programmes nationaux de référence et de la pertinence de ces systèmes en termes de techniques microbiologiques utilisées.

Quatre types d'informations peuvent être générés qui sont destinés à différentes catégories d'acteurs impliqués dans l'utilisation des antibiotiques (Tableau 13).

**Tableau 13 : Types d'information sur la résistance bactérienne (Allouch et al., 2001)**

Type	Objet	Utilisation
1	Analyse des populations bactériennes selon le niveau de sensibilité, au sein des différentes espèces	Etablissement des valeurs critiques permettant la classification des bactéries en « sensible » ou « résistante ».
2	Statistiques globales de résistance par espèce bactérienne	Aide à l'établissement du spectre d'activité, des indications
3	Résistance bactérienne dans les infections documentées : épidémiologie et facteurs de risque	Profils de probabilité d'activité des antibiotiques Aide à la prescription médicale courante
4	Prévalence, incidence et caractéristiques des bactéries multirésistantes	Détection de nouvelles épidémies Décisions sanitaires Politique d'antibiothérapie

#### Enquêtes ciblées

A côté des réseaux d'épidémiologie-surveillance généralement centrés sur une bactérie pathogène (animal ou zoonotique) ou un réservoir potentiel de gènes d'intérêt (« indicateur ») (Aarestrup, 1998), il importe de compléter le recueil d'information par des enquêtes épidémiologiques ponctuelles.

Ces dernières peuvent être conduites de façon rétrospective. Elles peuvent avoir pour objectif de repérer un facteur associé à l'émergence de la contamination par une bactérie présentant un phénotype de résistance nouveau (Ward et al., 2002; Gupta et al., 2003a). Il s'agit d'enquêtes de type cas-témoins ou de cohorte. D'autres études peuvent être menées au sein de collections de souches pour y rechercher (toujours rétrospectivement) des génotypes d'intérêt émergents (Faldynova et al., 2003; Gado et al., 2003).

Des enquêtes épidémiologiques prospectives peuvent également être faites dans le but de surveiller l'évolution de l'antibiorésistance de bactéries d'intérêt dans un contexte hospitalier (Chiappini et al., 2002), dans un contexte de santé animale (Arcangioli et al., 2000) ou encore afin de contrôler

les effets de l'interdiction d'un additif sur l'évolution des profils d'antibiorésistance d'une population bactérienne, avec des résultats parfois contrastés (exemple des VRE, entérocoques résistants à la vancomycine et de l'interdiction de l'avoparcine en Europe) (Kruse et al., 1999; van den Bogaard et al., 2000; Aarestrup et al., 2001a; Borgen et al., 2001). Elles doivent aussi être envisagées dans le but d'abonder une analyse (quantitative) des risques (Salisbury, 2002), en générant des données représentatives d'une population donnée, en repérant et en hiérarchisant des facteurs de risque associés.

#### Echantillonnage

Les modalités de recueil d'échantillons dans une population définie nécessitent un cadre méthodologique pour estimer l'indicateur de la résistance dans la population ciblée et permettre des analyses statistiques (Davison, 2000). Le nombre d'échantillons requis dépend des objectifs de l'étude, de la population visée et de la puissance statistique demandée. La taille de l'échantillon est limitée par des contraintes pratiques liées au coût du recueil et de l'analyse. Par exemple, pour estimer la proportion (prévalence) de bovins porteurs d'*E. coli* résistant dans un élevage de 200 animaux avec un intervalle de confiance à 95 %, de  $\pm 5$  %, l'étude de 132 animaux choisis aléatoirement sera nécessaire si la prévalence attendue est de 50 %. Cette estimation est basée sur un test parfait ayant 100 % de sensibilité et 100 % de spécificité et si la population ciblée au niveau de l'animal ou de la bactérie est homogène en ce qui concerne la résistance.

Plusieurs niveaux d'études peuvent être pris en compte dans le cas de la résistance aux antibiotiques :

- Gène de résistance
- Colonie bactérienne
- Bactérie viable (ex : isolat sur milieu de culture)
- Densité de l'inoculum
- Echantillon (ex : fèces)
- Animal individuel
- Groupe d'animaux (ex : classes d'âge)
- Population animale

La connaissance de la variabilité *a priori* de la résistance à chaque niveau et entre eux est nécessaire pour développer des stratégies de prélèvements appropriées.

D'un point de vue théorique, on peut donc analyser la mesure de la résistance du point de vue de l'espèce bactérienne, de l'hôte ou de la population animale. Les paramètres clés sont la moyenne et la distribution du nombre (b) de bactéries testées par sujet et le nombre et la proportion (p) de bactéries résistantes dans chaque sujet. Il n'est pas possible de relier directement la proportion (P) d'hôte portant des bactéries résistantes à la proportion de



bactéries résistantes sans connaître ces 4 composantes. De plus, il n'est pas possible de comparer directement les résultats d'études pour lesquels un ou plus de ces composants diffèrent. Ceci signifie qu'il n'est pas possible de comparer directement les résultats de deux études ayant différents nombres de bactéries testées par sujet et que des différences de prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les sujets peuvent résulter de différences (non mesurées) dans la distribution statistique des nombres de bactéries testées par sujet.

Si P est la proportion de sujet pour lequel une résistance à un antibiotiques est détectée, la relation entre P, p et b, s'écrit dans le cas le plus simple correspondant à un nombre de souches testées par hôte b égal, et une proportion p égale chez chaque sujet, de la manière suivante :  $P=1-(1-p)^b$   
 P est aussi sensible à une variation de b qu'à une variation de p. On ne peut donc pas relier p à P sans connaître b qui est dépendant de la taille de la population bactérienne chez chaque hôte, de la méthode de prélèvement et de la méthode d'isolement.

Plus généralement, si pour un sujet i dans un échantillon de N sujets,  $b_i$  bactéries sont testées et que la proportion  $p_i$  de résistance varie d'un sujet à l'autre, alors on obtient

$$P = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (1 - (1 - p_i)^{b_i})$$

P est donc dépendant des valeurs de  $p_i$  et  $b_i$ . Une hétérogénéité dans les valeurs de  $p_i$  ou de  $b_i$  influence la relation entre P et les taux individuels  $p_i$ .

La proportion  $p_i$  au niveau de chaque individu est le rapport de la taille de la population de bactéries résistantes par la population totale. La mesure de ce rapport au sein des sous-populations bactériennes d'une flore complexe dépend donc de la taille de ces populations au sein de l'inoculum analysé par les méthodes bactériologiques plus ou moins sélectives. Au niveau général, la relation entre p (taux de résistance) et P (prévalence chez l'hôte) est simplifiée si une seule souche, isolée de manière aléatoire du prélèvement issu d'un animal lui même choisi au hasard au sein de lots différents, est testée du point de vue de la résistance aux antibiotiques.

#### Méthodes microbiologiques

Le choix des méthodes microbiologiques dépend des objectifs du programme de surveillance ou du type d'étude et influence donc les résultats. Pour un échantillon donné obtenu sur un animal, il est possible d'isoler aléatoirement une ou quelques souches en utilisant un milieu sélectif ou non de l'espèce

bactérienne visée. Il est également possible d'isoler les bactéries résistantes à un antibiotique donné en utilisant un ou plusieurs milieux sélectifs contenant différentes concentrations de l'antibiotique. Les performances en termes d'isolement sont alors dépendantes de la taille de l'inoculum utilisé sur chaque boîte, du type de milieu sélectif et de la taille des populations bactériennes. Enfin pour des bactéries ayant des densités très faibles au sein de la flore étudiée, la procédure d'isolement peut inclure une étape d'enrichissement comme dans le cas de la recherche de salmonelles (Nolan et al., 1995).

Pour des isolats cliniques, on suppose en général que l'on a une diffusion clonale et que l'antibiogramme vaut pour les souches individuelles (Andrews, 2001a; Andrews, 2001b). Cependant pour les flores commensales, il n'y a pas de recommandations sur les méthodes appropriées pour mesurer quantitativement la résistance dans ces populations. Au sein d'un échantillon, l'abondance en souches résistantes peut s'exprimer sous forme de nombre de bactéries par unité de poids (Linton et al., 1978) ou sous forme de proportion (pourcentage) de bactéries résistantes (Langlois et al., 1983; Dunlop et al., 1998b). Dans ces études, l'estimation de la résistance dépend d'une mesure sur des isolats provenant de population contenant des millions de bactéries. Récemment, des méthodes d'analyse de la distribution de la résistance à un antibiotique donné au sein de la population d'*E. coli* ont été proposées (Humphry, 2002).

#### **4.4. Les indicateurs de la résistance**

Plusieurs types d'indicateurs de la résistance sont donc utilisables pour exprimer les résultats de programme de surveillance ou ceux issus d'études épidémiologiques.

Pour les programmes de surveillance, il est recommandé de recueillir les données brutes (CMI, diamètres d'inhibition) pour chaque souche bactérienne récoltée, conjointement à des informations épidémiologiques et/ou cliniques.

Les résultats sont rapportés sous forme d'histogrammes de distribution de la sensibilité des souches à un antibiotique donnée. Ce type de données permet d'identifier et de décrire les sous-populations de souches selon leur niveau de sensibilité au sein des principales espèces bactériennes. Ces données sont utiles pour définir les valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques (S, I, R).

Pour les principales espèces bactériennes, les résultats interprétés, reportés sous la forme du nombre de souches résistantes par le nombre total de souches testées, sont des taux derésistance à un (des) antibiotique(s) donné(s). Ce taux de résistance est exprimé sous forme d'un pourcentage, en fonction de paramètres pertinents disponibles et dépendants des informations recueillies lors de l'échantillonnage. Il est possible d'analyser le taux de

résistance en fonction de l'espèce animale d'origine, du moment de l'échantillonnage (diagnostic, surveillance à l'abattoir), du type d'élevage (si l'information est recueillie), de l'état de santé des animaux (maladie, sain), du site d'isolement (caecal, fécal, pulmonaire, etc.).

Dans le cas d'infections documentées, il s'agit d'exprimer les résultats selon l'origine du prélèvement en fonction de paramètres cliniques et épidémiologiques connus pour être des facteurs de risque de résistance (ex : antécédents d'antibiothérapie, rechute), pour les principales catégories d'infections. Pour les bactéries pathogènes vétérinaires, ces données peuvent servir à l'établissement du spectre d'activité de la molécule et de ses indications thérapeutiques (résumé des caractéristiques du produit) et sont utilisés dans le cadre de l'enregistrement des médicaments et de l'aide à la prescription. Si les lieux et moments de recueil sont standardisés entre pays avec des méthodes microbiologiques équivalentes, ces informations peuvent servir de base à un programme de surveillance international.

Les modalités de prélèvement influent donc sur la nature de la population échantillonnée et donc sur le taux de résistance mesuré dans l'espèce bactérienne. Ainsi, par exemple, le taux de résistance à un antibiotique chez *E. coli* dépend du statut clinique de l'animal (sain, malade), du site de prélèvement (fécal, urinaire, pulmonaire), de l'âge de l'animal, etc.

Lorsqu'il est possible de mesurer au sein de la population le nombre de sujets porteurs de bactéries résistantes, il est possible de mesurer la prévalence de la résistance qui s'exprime sous forme d'un ratio égal au nombre de sujets positifs (porteur de la bactérie résistante) par rapport au nombre d'animaux testés. Cette prévalence peut être calculée pour des individus ou pour des groupes d'animaux tels que les lots abattus ou les élevages. La prévalence est alors exprimée sous la forme du ratio égal au nombre de groupes positifs par rapport au nombre de groupes testés.

Les résultats en termes de prévalence dépendent de la densité de la population bactérienne résistante chez chaque sujet testé, c'est-à-dire de la proportion de souches résistantes au sein d'une population bactérienne donnée dans un échantillon et de la capacité de détection de la méthode d'analyse utilisée.

La modification du taux de résistance peut être du fait de la diffusion d'un clone résistant remplaçant une fraction de la population sensible ou d'un changement dans la pression de sélection entraînant un accroissement de la population résistante. La détection de ce changement peut être obtenue par l'analyse des séries chronologiques.

**A retenir**

Plusieurs types d'indicateurs de la résistance sont utilisables pour exprimer les résultats de programme de surveillance ou ceux issus d'études épidémiologiques. Pour les principales espèces bactériennes, les résultats interprétés, reportés sous la forme du nombre de souches résistantes par le nombre total de souches testées, sont des taux de résistance à un (des) antibiotique(s) donné(s). Lorsqu'il est possible de mesurer au sein de la population le nombre de sujets porteurs de bactéries résistantes, il est possible de mesurer la prévalence de la résistance qui s'exprime sous forme d'un ratio égal au nombre de sujets positifs (porteur de la bactérie résistante) par rapport au nombre de sujets testés.

### **III. Analyse de l'impact de l'usage des antibiotiques sur la résistance bactérienne chez l'animal**

La résistance bactérienne aux antibiotiques se retrouve dans différents réservoirs, environnemental, humain et animal.

L'expertise scientifique du rôle des antibiotiques dans la constitution d'un réservoir de résistance chez l'animal, doit pouvoir conduire à des recommandations éclairées sur l'usage des antibiotiques, dans un contexte de santé animale et publique. Cette expertise repose sur un certain nombre de travaux et de publications dont la qualité doit être analysée avec une rigueur à la hauteur des enjeux sanitaires et économiques associés.

L'analyse ci-dessous concerne les études publiées portant sur la résistance aux antibiotiques étudiée sur des populations animales dans le secteur de l'élevage.

#### **1. Etude de l'émergence de la résistance**

L'émergence de la résistance aux antibiotiques peut avoir plusieurs définitions en fonction du phénomène étudié :

- au niveau de la bactérie, l'émergence peut être due à l'acquisition d'un nouveau mécanisme de résistance par une bactérie naturellement sensible à un antibiotique ;

15 <http://www.dfvf.dk>

- au niveau d'une population, l'émergence peut être caractérisée par l'apparition d'un nouveau mécanisme de résistance à un antibiotique au sein d'une population bactérienne inconstamment sensible à cet antibiotique, ou à l'augmentation de la prévalence de la résistance au sein d'une population faiblement résistante à un antibiotique donné.

La probabilité de mise en évidence d'un nouveau phénotype ou mécanisme au sein d'une population dépend de la taille de l'échantillon de la population étudiée. Cependant, l'utilisation de milieux de culture contenant un antibiotique

permet de mettre en évidence, au sein d'une flore complexe, des bactéries résistantes à cet antibiotique même si elles sont présentes en faible proportion. La capacité de détection dépend du nombre de souches collectées et analysées ainsi que de la vigilance de l'équipe en charge de l'analyse des souches pour reporter l'émergence du phénomène.

La probabilité de détecter un événement rare dépend de sa fréquence au sein de la population.

Compte tenu des outils d'observation disponibles, il est aujourd'hui difficile de dater l'émergence d'une résistance dans une espèce bactérienne ou une population. L'utilisation de la littérature scientifique pour résoudre ce problème, même de façon qualitative, peut avoir de l'intérêt. Néanmoins, la hiérarchie chronologique des dates de publication de l'émergence d'un nouveau mécanisme de résistance ne reflète pas nécessairement la chronologie de l'émergence. On peut aussi souligner que les résultats relatifs à une émergence peuvent faire l'objet d'un biais de « notoriété » (études de la résistance ciblées à un temps donné sur des molécules nouvellement mises sur le marché), sauf si la résistance est directement liée à des nouvelles molécules antibiotiques d'origine synthétique, pour lesquelles aucune résistance naturelle n'est possible.

## 2. Etude de la sélection et de la diffusion de la résistance

La relation entre l'usage des antibiotiques chez l'animal et la résistance aux antibiotiques chez des bactéries isolées chez l'animal peut être appréciée par trois types d'approche:

- une approche descriptive : description conjointe de l'usage des antibiotiques et des taux de résistance en fonction de paramètres tels que le temps, la filière animale, le type d'élevage, les modalités d'usage (ces paramètres n'étant pas indépendants) ;
- une approche expérimentale : mise en oeuvre d'essais cliniques ne visant pas à connaître la relation entre exposition et résistance dans la population réelle, mais uniquement à vérifier une hypothèse par un protocole expérimental *ad hoc* et dont la mise en oeuvre se fait dans des conditions éloignées de la réalité; les résultats ne peuvent donc être extrapolés qu'avec une extrême précaution (ce type d'étude est en particulier conduit dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un additif antibiotique à l'alimentation animale ou d'un médicament vétérinaire) ;
- une approche étiologique : quantification de la relation entre usage d'antibiotiques et risque de colonisation des animaux par des bactéries résistantes à ces molécules, en conditions réelles; ces études épidémiologiques doivent pouvoir démontrer le lien de cause à effet selon les critères de Hill, dont la chronologie (la cause doit précéder l'effet), l'effet dose ou durée, la force d'association, et la réversibilité.

## **2.1. Etude de l'impact sur les bactéries responsables de zoonose**

Les travaux présentés ci-dessous portent essentiellement sur *Campylobacter* et *Salmonella*.

### *Campylobacter*

#### *- Etudes descriptives*

Les études descriptives portant sur la résistance des *Campylobacter* permettent de comparer l'évolution de taux de résistance à divers antibiotiques avec leurs modalités d'usage, principalement en filières aviaire et porcine.

Ainsi, un lien temporel est suggéré par de nombreux auteurs entre la mise sur le marché de quinolones en élevage, et chez l'homme, et l'augmentation observée ultérieurement de la résistance, à cette famille d'antibiotiques, de souches de *Campylobacter* isolées chez l'animal et l'homme (Endtz et al., 1991; Zhang et al., 2003). Cette augmentation a été observée en filière aviaire, par comparaison des taux de résistance au début des années 1990 et au début des années 2000, en Allemagne (Luber et al., 2003) et en France (Desmonts et al., 2003). Les travaux de surveillance danois (programme DANMAP) ont décrit une augmentation du taux de résistance à l'acide nalidixique, pour les *Campylobacter jejuni* isolés en filière aviaire de 1996 à 2001, passant de 0% à 8% ; à l'inverse, chez le porc, les taux de résistance observés chez *Campylobacter coli* ont diminué de 17% à 5%, de 1998 à 2001, coïncidant avec la période suivant le retrait d'une formule orale composée de fluoroquinolone (DANMAP, 2001; DANMAP, 2003).

De même, des taux plus élevés de résistance aux macrolides chez des souches de *C. coli* isolées de porcs sont attribués, par plusieurs auteurs, à l'utilisation importante de macrolides, en tant que facteur de croissance et de médicaments vétérinaires, dans la filière porcine (Van Looveren et al., 2001; van Boven et al., 2003);(Aarestrup et al., 1997; Aarestrup et al., 1998c) ; les mêmes observations sont issues des plans de surveillance français (données non publiées).

Des associations du même type, entre les taux de résistance observés et les usages selon les filières, sont également rapportées pour la streptomycine

(Aarestrup et al., 1997; Aarestrup et al., 1998b; Pezzotti et al., 2003) et les quinolones (Aarestrup et al., 1998b).

Des différences de fréquences de sensibilité des *Campylobacter* isolés de mêmes espèces animales, selon les pays, pourraient résulter, au moins dans certains cas, de différences d'utilisation des antibiotiques (Tableau 23). Les comparaisons sont cependant relativement difficiles à réaliser en l'absence de système de surveillance des usages, harmonisés d'un pays à l'autre.

**Tableau 23 : Pourcentage de résistance des souches de *Campylobacter jejuni* isolées de poulets selon les pays**

Pays	<i>Erythromycine</i>	<i>Tetracycline</i>	<i>Enrofloxacin</i> (E) ou <i>ciprofloxacin</i> (C)	Référence
<i>Danemark</i>	0	4	0 (E)	(Aarestrup et al., 1997)
<i>Espagne</i>	0	31,8	98,7 (C)	(Saenz et al., 2000)
<i>France</i>	0,3	57	17 (E)	(Avrain et al., 2003)
<i>Irlande du Nord</i>	0,4	13	2,9 (C)	(Oza et al., 2003)
<i>Taiwan</i>	17	83	92 (C)	(Li et al., 1998)

Dans une même filière, des études descriptives ont également rapporté des différences selon le type de production. Par exemple, en filière aviaire, les *C. coli* sont trouvés moins souvent résistants chez les poules pondeuses par rapport aux volailles de chair (Van Looveren et al., 2001), ce qui pourrait être lié à une moindre utilisation d'antibiotiques chez les pondeuses. Cette association n'est pas toujours observée. En effet, par exemple, en filière bovine, Sato et al (Sato et al., 2004) rapportent des niveaux de résistance semblables entre des souches

isolées de vaches d'élevages conventionnels ou issues de l'agriculture « biologique ». Par ailleurs, Piddock et al. n'observent pas de relation entre la sensibilité de souches isolées d'élevages de vaches laitières et les traitements administrés aux animaux (Piddock et al., 2000).

**- Etudes expérimentales**

L'émergence et la persistance de souches de *Campylobacter* résistantes aux fluoroquinolones par un traitement à l'enrofloxacin à dose thérapeutique, a été démontrée expérimentalement pour *C. coli* chez le porc (Delsol et al., 2004b) et pour *C. jejuni* chez le poulet (van Boven et al., 2003, McDermott et al. 2002).

L'effet du traitement n'a pas été démontré sur le taux de résistance des colibacilles (van Boven et al., 2003). Ces expériences démontrent que, dans les conditions expérimentales, l'exposition aux fluoroquinolones est responsable d'une émergence rapide de la résistance des *Campylobacter* vis à vis de ces antibiotiques ; cette résistance peut persister après l'arrêt de l'exposition.

**- Etudes étiologiques**

Une étude récente a démontré l'association entre l'usage thérapeutique de fluoroquinolones en filière aviaire et l'augmentation du taux de résistance à cet antibiotique des *Campylobacter* isolés de fèces (Griggs et al., 2005; Humphrey et al., 2005). Une mutation sur le gène *gyrA*, identifiée pour la majorité des souches résistantes, correspondrait au mécanisme à l'origine de la persistance des souches résistantes.

L'effet des antibiotiques sur la résistance, selon les types de production (label, standard ou export), a été étudié en France en filière aviaire dans le cadre d'une étude de cohorte (Avrain et al., 2003). Les facteurs de croissance (bacitracine zinc, spiramycine, virginiamycine, et phosphate de tylosine) autorisés en France jusqu'au 30 juin 1999, étaient utilisés uniquement en production standard, et exceptionnellement en production destinée à l'export. Les résultats de cette étude suggèrent des associations entre les usages et les taux de résistance observés chez les animaux ; ainsi, ont été rapportées, en filière standard, une association entre l'usage d'avilamycine et une augmentation de la résistance à la tétracycline, et toutes filières confondues, l'usage d'oxytétracycline et de doxycycline avec une augmentation significative des taux de résistance à la tétracycline. *Salmonella*

**- Etudes descriptives**

Les principaux travaux descriptifs portant sur *Salmonella* permettent de distinguer les effets d'un traitement à dose thérapeutique, d'une administration à dose sub-thérapeutique.

**Usage thérapeutique**

En France, en filière bovine, l'étude de la résistance à l'apramycine (médicament exclusivement vétérinaire) et à la gentamicine chez *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium, isolée chez le veau, a montré la rapidité de la



diffusion de ce type de résistance (par production de l'aminoglycoside acetyltransferase AAC(3)IV) au sein des élevages, une fois celle ci apparue quatre ans après l'autorisation de mise sur le marché de l'apramycine (Chaslus-Dancla et al., 2000). L'hypothèse émise par les auteurs de cette étude, en l'absence de données sur les consommations d'antibiotiques, porte sur les conséquences d'un usage important d'une nouvelle molécule par les vétérinaires, lorsqu'elle est autorisée.

Les travaux danois, en revanche, indiquent que les taux de résistance des *Salmonella* à l'apramycine restent bas en filières porcine et bovine, voire nuls en filière aviaire, dans les conditions de leurs études (Aarestrup et al., 1998b).

Ces mêmes travaux danois n'ont pas mis en évidence d'augmentation significative des taux de résistance chez *Salmonella* à l'égard de différentes familles d'antibiotiques utilisées en médecine vétérinaire (colistine, différents aminosides, quinolones, trimethoprim). Des différences ont été mises en évidence, en revanche, selon les filières animales à l'égard de la streptomycine, des sulfamides, et de la tétracycline, avec des taux de résistance toujours plus élevés en filière porcine.

#### Usage sub-thérapeutique

Aux Etats-Unis, l'exposition au carbadox, en tant que facteur de croissance, a été comparée aux taux de résistance chez *Salmonella* isolée du porc. Edrington et al. (Edrington et al., 2001) concluent sur ce type d'observation, que l'usage à dose sub-thérapeutique de cet antibiotique n'augmente pas la prévalence des *Salmonella* résistantes. Les travaux danois des années 1995-1996 aboutissent aux mêmes conclusions (Aarestrup et al., 1998c).

#### - *Etudes expérimentales*

Plusieurs études expérimentales ont été réalisées, chez le porc, pour définir l'impact des modalités d'usage des antibiotiques sur la résistance de *S. Typhimurium*, préalablement inoculée. Les résultats apparaissent variables selon les modalités d'étude.

Une corrélation positive entre les concentrations en chlortétracycline et le nombre de *S. Typhimurium* multirésistantes, de type DT104, excrétées a été démontrée, suggérant la responsabilité des traitements antibiotiques, administrés à des doses thérapeutiques, dans la diffusion de ces micro-organismes responsables de zoonose (Delsol et al., 2003; Delsol et al., 2004a). Quelques travaux concernant l'effet d'un traitement à l'enrofloxacin sur la résistance des salmonelles, indiquent qu'une administration par voie orale, dans les conditions recommandées lors d'un usage thérapeutique vétérinaire, entraîne une augmentation de la fréquence de salmonelles résistantes aux quinolones (Wiuff et al., 2003; Delsol et al., 2004a). Chez la dinde, l'étude de l'impact de la dose d'un traitement antibiotique sur l'émergence et la diffusion de la résistance de

salmonelles a été développée pour la chlortétracycline (Nivas et al., 1976). L'administration de cet antibiotique a généré l'apparition de résistance à de multiples antibiotiques ; dans cette étude, l'effet dose n'a pas été clairement démontré sur cette émergence ; en revanche les doses thérapeutiques ont été associées à une réduction plus importante de l'excrétion des salmonelles.

Des différences d'impact peuvent être observées selon la voie d'administration. Un traitement par voie intramusculaire exerce une pression de sélection moindre sur les bactéries du tube digestif par rapport à une administration orale. Cette différence d'exposition, est un argument permettant d'expliquer des taux de résistance plus faibles aux fluoroquinolones chez des salmonelles isolées de porc recevant un traitement intramusculaire à l'enrofloxacin, par rapport à un traitement oral (Wiuff et al., 2003). Dans cette étude, l'augmentation des doses du traitement intramusculaire s'est accompagnée d'une réduction plus rapide de l'excrétion des salmonelles ainsi que du taux de résistance aux fluoroquinolones. Alors que l'impact d'un traitement antibiotique sur la résistance de salmonelles artificiellement inoculées a été démontré chez le porc, avec différents traitements antibiotiques administrés par voie orale (Ebner et al., 2000), Mathew et al. (Mathew et al., 2001) n'ont pas mis en évidence cet effet, quelles que soient les caractéristiques du traitement (administration orale d'une dose maximale constante d'apramycine, concentration croissante, expositions répétées ponctuelles à dose maximale ou alternance avec d'autres antibiotiques).

#### **- Etudes étiologiques**

L'association entre l'exposition à l'apramycine à des doses sub-thérapeutiques et la résistance des salmonelles à divers antibiotiques de la famille des aminosides utilisés notamment en médecine humaine, a été étudiée par l'équipe de Edrington, dans le cadre d'une étude de cohorte chez le porc (Edrington et al., 2001). Les résultats de cette étude ne mettent pas en évidence d'effet de cette exposition sur le taux de résistance des salmonelles à l'égard des aminosides testés, par rapport à des animaux non exposés. Les auteurs s'étonnent de ce résultat et mettent en avant le faible nombre d'animaux testés, compte tenu d'études similaires ayant démontré une corrélation positive entre l'exposition à l'apramycine et la résistance chez *E. coli* (Mathew et al., 1998); cependant, ces résultats corroborent les résultats descriptifs des études danoises, citées plus haut.

## **2.2. Etude de l'impact sur les bactéries de la flore commensale intestinale**

L'effet des antibiotiques sur la flore intestinale commensale des animaux traités a porté principalement sur la flore coliforme et le genre *Enterococcus* (*E. faecalis* et *E. faecium*). Flore coliforme

#### **- Etudes descriptives**

Les études descriptives portant sur la résistance de la flore coliforme permettent de comparer l'évolution de taux de résistance de cette population bactérienne aux modalités d'usage des antibiotiques, dans les filières de production bovine, aviaire et porcine.

L'émergence de la résistance dans la flore coliforme, liée à l'usage des antibiotiques vétérinaires, peut être illustrée par les travaux de Chaslus-Dancla et al. (Chaslus-Dancla et al., 1986a) relatifs à la résistance détectée à l'apramycine et la gentamicine de souches d'*E. coli* isolées en filière bovine, lors de deux épidémies de salmonellose.

Les taux de résistance aux antibiotiques chez *E. coli* sont dépendants des filières animales, suggérant un lien avec les modalités d'usage (voie d'administration, dose, âge des animaux, etc.). Chez le porc, les taux de résistance à divers antibiotiques observés chez *E. coli* isolés de la flore intestinale, sont associés à la fréquence d'exposition aux antibiotiques reçus durant les 6 premières semaines de vie (Sunde et al., 1998). En production de dindes, des comparaisons de l'exposition à la gentamicine et des taux de résistance associés, chez *E. coli*, ne démontrent pas d'impact des usages sub-thérapeutiques de cet antibiotique ; en revanche, certaines pratiques d'exposition des œufs et de jeunes poulets, à doses thérapeutiques, pourraient être à l'origine de taux de résistance plus élevés lors des premières semaines de vie des animaux (Dubel et al., 1982).

Selon la voie d'administration, on constate des différences sur la résistance de souches d'*E. coli* à l'enrofloxacin, autorisée sous forme orale pour une utilisation chez la volaille dans plusieurs pays européens alors qu'aucune formulation orale n'est disponible pour les porcs ou les bovins (plusieurs molécules de la famille des fluoroquinolones sont autorisées sous forme injectable chez les bovins, le nombre de molécules autorisées est plus faible pour les porcins). Ainsi, au Pays-Bas, par exemple, les taux de résistance à la ciprofloxacine sont plus élevés pour des souches d'*E. coli* isolées de dindes, par rapport à celles du porc (Nijsten et al., 1994).

En France, plus récemment, les variations dans les taux de résistance chez *E. coli* ont été étudiées en fonction du mode de production et des règles d'utilisation des antibiotiques. Une étude menée par les instituts techniques de l'élevage fournit quelques informations sur les différences existant entre le type d'élevage (élevage « bio » et élevage conventionnel fort utilisateur d'antibiotiques), et les taux de résistance aux antibiotiques chez des souches d'*E. coli* isolées de la flore intestinale de veaux, porcs ou dindes (Tableau 24).

Les résultats obtenus sur quelques élevages ne sont pas représentatifs de la situation d'une filière de production, mais illustrent que les fréquences de résistance observées dans les 3 élevages conventionnels de l'étude sont plus élevées pour les représentants des familles d'antibiotiques les plus couramment

utilisés et depuis le plus longtemps (amoxicilline, streptomycine, tétracycline, sulfamides, triméthoprime et acide oxolinique). A noter que, pour le porc, les taux de résistance sont plus faibles pour l'amoxicilline et l'acide oxolinique. Chez la dinde, le taux de résistance pour la spectinomycine est nul. Ces différences s'expliquent par l'autorisation de mise sur le marché, ou non, de formulation de ces antibiotiques dans les différentes filières de production.

Les taux de résistance pour les familles plus anciennes (tétracycline, sulfamides, amoxicilline, triméthoprime) sont également élevés en élevage « Bio ». Ceci pourrait s'expliquer par la diffusion des souches résistantes dans les différents environnements et le fait que plusieurs années peuvent être nécessaire pour réduire la fréquence de résistance à un antibiotique, même en absence de pression de sélection.

De plus, la plupart des études décrivant l'usage d'antibiotiques sur la résistance de la flore coliforme des animaux mettent en avant, dans leur conclusion, l'effet de facteurs écologiques sur l'apparition et la diffusion de populations bactériennes résistantes.

Une des premières études dans ce domaine démontre, chez le poulet, que la résistance à la tétracycline de la population coliforme augmente durant la durée du traitement ; pendant la même période, la population coliforme de la flore intestinale de l'éleveur et de sa famille proche augmente également, suggérant le transfert des souches résistantes de l'animal à l'homme (Levy et al., 1976). De même, l'introduction de la nourseothricine, un agent antimicrobien de la famille des streptothricines, comme additif à l'alimentation animale chez le porc a entraîné la sélection de la résistance à la streptothricine chez des bactéries coliformes de la flore intestinale du porc. Des bactéries résistantes à la streptothricine ont été également retrouvées dans la flore intestinale des personnels travaillant dans les porcheries, et en moins de deux ans, chez les familles de ces personnels ainsi que dans la population vivant dans les communautés proches (Hummel et al., 1986). Ces exemples seraient en faveur d'une diffusion des bactéries susceptible de se faire entre animaux d'un même élevage.

**Tableau 24 : Taux de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* isolés soit d'un élevage « agriculture biologique » soit d'un élevage conventionnel fort consommateur d'antibiotiques dans 3 filières de production (Bertrand et al., 2002).**

	Porc		Veau			Dinde
	Bio (n=240)	Conv (n=240)	Bio (n=240)	CcBio (n=240)	Conv (n=240)	
Amoxicilline	22 %	64 %	7 %	3 %	47 %	99 %
Amoxicilline+Acide Clavulanique	0 %	7 %	0 %	0 %	16 %	18 %
Céfalexine	0 %	2 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Néomycine	8 %	2 %	1 %	0 %	42 %	75 %
Gentamicine	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	27 %
Apramycine	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	16 %
Spectinomycine	0 %	0 %	13 %	37 %	8 %	12 %
Streptomycine	29 %	63 %	41 %	72 %	57 %	94 %
Tétracycline	51 %	100 %	69 %	96 %	49 %	99 %
Chloramphénicol	2 %	42 %	9 %	1 %	17 %	77 %

Sulfamides	24 %	75 %	25 47 %	55 %	98 %
Triméthoprim	24 %	70 %	9 37 %	13 %	53 %
Acide oxolinique	6 %	65 %	0 1 %	2 %	90 %
Fluméquine	3 %	62 %	0 0 %	2 %	75 %
Enrofloxacin	0 %	14 %	0 0 %	0 %	48 %

Bio : production labellisée « Biologique », Conv : production conventionnelle

### - Etudes expérimentales

Les travaux de Delsol (Delsol et al., 2003; Delsol et al., 2004a) démontrent expérimentalement l'acquisition de mécanismes de résistance par la flore coliforme, en comparant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) à l'égard de chlortétracycline pour des souches de porcs traités à cet antibiotique, par rapport à des souches isolées d'animaux non traités.

Les effets des modalités d'administration des antibiotiques, sur l'acquisition de résistances par *E. coli*, ont été démontrés expérimentalement dans plusieurs espèces animales.

Chez le porc, Mathew et al. (Mathew et al., 2002) démontrent qu'entre différentes conditions d'administrations d'antibiotiques, celles correspondant à une exposition orale à l'apramycine, répétée, ponctuelle, à dose maximale, conduit à des taux de résistance les moins importants.

Chez le poulet, un traitement par voie orale aux quinolones conduit à la disparition de *E. coli* et n'induit donc pas de résistance dans cette population (van Boven et al., 2003),

Chez le bovin, (Stabler et al., 1982) la résistance de la flore coliforme augmente suite à un traitement à la tétracycline ; cette augmentation est différente selon que le traitement est donné à dose sub-thérapeutique ou thérapeutique. Dans le premier cas, l'augmentation s'inscrit dans le temps, dans le second, elle se manifeste deux jours après le traitement et ne persiste pas après l'arrêt.

Des paramètres d'écologie microbienne sont également mis en avant, dans ce type d'étude, pour expliquer l'impact des antibiotiques sur la résistance bactérienne. Ainsi, un suivi de la flore intestinale de porc permet de mettre en évidence que l'augmentation des taux de résistance des *E. coli*, lors d'un traitement par voie générale avec une fluoroquinolone, est liée à l'élimination de

la population d'*E. coli* sensible aux quinolones, favorisant la colonisation des animaux par une population d'*E. coli* résistante (Wiuff et al., 2003). La contamination des animaux par l'environnement a également été mise en avant dans une étude expérimentale ayant démontré une augmentation du taux de résistance des *E. coli* à la tétracycline, chez le porcelet n'ayant pas reçu d'antibiotique, lors des manipulations des animaux au moment du sevrage (Hinton et al., 1985). Chez le poulet, Hinton et al. (Hinton et al., 1986) mettent en avant l'équilibre de flore variant avec l'âge des individus, pour expliquer une augmentation des taux de résistance à la tétracycline, à la fois chez des animaux exposés à l'oxytétracycline et chez des animaux non exposés, sans toutefois avoir d'effet sur le nombre total de *E. coli*. - *Etudes étiologiques*

Une des premières études épidémiologiques dans ce domaine a mis en évidence, dans le cadre d'une étude transversale, une association entre le taux de résistance des bactéries entériques à Gram négatif, avec la pression de sélection dans différentes filières de production animale (Siegel et al., 1974), avec des taux de résistance les plus élevés chez des souches d'*E. coli* isolées de porcs. Plusieurs études épidémiologiques récentes, dans cette filière, ont confirmé l'impact des antibiotiques sur l'acquisition de résistances chez *E. coli*.

Les travaux français de Belloc et al. (Belloc et al., 2000) sont démonstratifs de la pression de sélection exercée par la fluméquine. Ils vérifient la chronologie des événements ainsi que la réversibilité de l'effet de l'antibiotique, avec une disparition des souches résistantes deux mois après l'arrêt du traitement.

L'impact des modalités d'usage des antibiotiques a été approfondi dans le cadre d'une étude de cohorte (Dunlop et al., 1998b). Une des conclusions de cette étude est la mise en évidence d'un risque plus important de sélection de souches résistantes d'*E. coli* lorsque les antibiotiques sont dispensés à dose sub-thérapeutique dans la nourriture, par rapport à des traitements individuels.

Par ailleurs, les effets observés chez *E. coli* varient selon la nature de l'antibiotique et l'âge des animaux (Mathew et al., 2001). Enterococcus

#### - *Etudes descriptives*

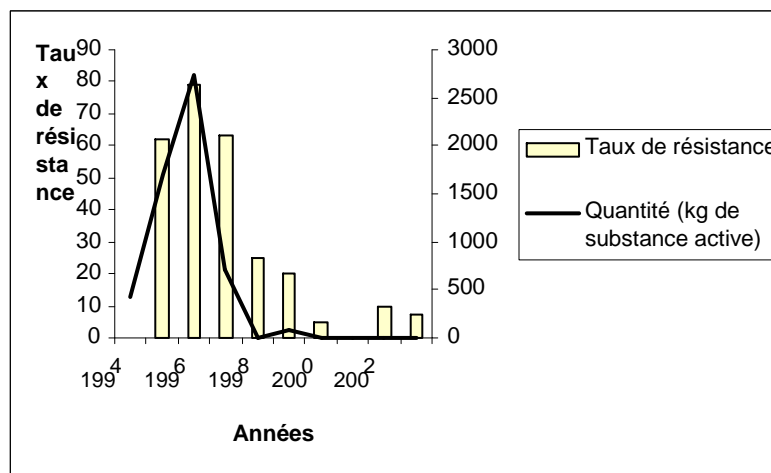
Le programme DANMAP a identifié les entérocoques comme la population bactérienne intestinale qui présentait les taux de résistance les plus élevés, par rapport aux autres bactéries visées par ces plans de surveillance (Aarestrup et al., 1998c).

Les résultats de cette surveillance permettent de corrélérer des différences de taux de résistance avec des pratiques différentes selon les filières animales.

Ainsi, les taux de résistance rapportés pour *E. faecium* vis à vis de l'avilamycine, utilisé en filière aviaire (Figure 10), étaient de près de 80% dans cette filière, contre 2 % en filière porcine et 0% en filière bovine en 1996 ; de même, les taux de résistance chez cette espèce bactérienne à l'égard de la bacitracine (utilisé en filières aviaire et porcine, et interdit depuis 1998 en

Europe) étaient de 31% et 41% respectivement en filières porcine et aviaire, contre 8% en filière bovine. Les résultats français de surveillance conduisent aux mêmes observations (Afssa-b, 2002).

Les travaux de surveillance descriptive ont également permis de mettre en évidence des différences de taux de résistance, selon les pays européens. Ainsi, dans une étude portant sur la résistance de *E. faecium* en filière porcine, Aarestrup et al. (Aarestrup et al., 2002a) ont mis en évidence des taux de résistance, à divers antibiotiques utilisés en tant que facteurs de croissance ou à titre thérapeutique, plus élevés en Espagne et au Danemark par rapport à la Suède. Cette différence serait corrélée aux pratiques d'usages des antibiotiques selon les pays.



**Figure 10 : Variation des niveaux de résistance chez *Enterococcus faecium* isolés des fèces de volaille au Danemark en fonction des quantités d'avilamycine consommées (d'après source DANMAP).**

*- Etudes expérimentales*

Les principaux travaux expérimentaux dans ce domaine consistent à étudier les effets d'antibiotiques, utilisés comme facteurs de croissance.

Concernant la tylosine, des études chez le porc, ont démontré qu'une exposition par voie alimentaire à des doses comparables à un usage vétérinaire (aliment supplémenté avec 30 µg/g de tylosine), est responsable d'une augmentation immédiate du taux de résistance aux macrolides des entérocoques intestinaux (Aarestrup et al., 1998a). Les mêmes types de résultats ont été obtenus sur des entérocoques et des staphylocoques d'origine nasale ou isolés de la peau de porcs (Christie et al., 1983).

Les conclusions de travaux réalisés chez le poulet traité à la tylosine à des doses plus fortes (550 mg/l d'eau de boisson), sont en revanche nuancées (Hinton et al., 1986; Kaukas et al., 1987). En effet, dans ces expériences, il est constaté une augmentation du taux d'entérocoques résistants à la tylosine à la fois chez les animaux traités et non traités. D'autres facteurs ont été mis en avant dans cette



étude, telle que la variation, en fonction de l'âge des animaux, de la composition en espèces d'entérocoques communément résistantes à la tylosine. Dans la même espèce animale, la sélection de l'espèce la plus résistante dans la flore intestinale lors d'un traitement à la tylosine (par exemple *E. faecium* par rapport à *E. gallinarum*), est illustrée par les travaux de Kaukas et al. (Kaukas et al., 1988).

Concernant l'avoparcine, glycopeptide utilisé jusqu'en 1997 en Europe comme facteur de croissance principalement en filières aviaire et porcine, des études expérimentales chez le poulet ont démontré un effet sélectif de l'administration de cet antibiotique sur *E. faecium* porteur du gène de résistance *vanA* (Robredo et al., 1999).

Des travaux américains portant sur l'effet de la virginiamycine, facteur de croissance autorisé aux Etats-unis, font apparaître l'émergence de résistance à différentes familles d'antibiotiques (ampicilline, ciprofloxacine, tétracycline) chez *E. faecium* isolés de poulets ou de porcs traités. L'analyse moléculaire des souches suggère une dissémination possible entre les animaux (Donabedian et al., 2003).

#### - Etudes étiologiques

Quelques travaux épidémiologiques apportent une démonstration de l'impact de l'usage des facteurs de croissance antibiotiques sur l'acquisition de résistance des entérocoques en filière de production animale.

L'association épidémiologique entre la consommation d'avoparcine en filière aviaire et porcine, et le taux de résistance des *E. faecium* à la vancomycine a été démontrée par une étude de cohorte rétrospective au Danemark (Bager et al., 1997). Les risques relatifs étaient de 2,9 (1,4-5,9) et 3 ,3 (0,9-12,3) respectivement en filières aviaire et porcine. En outre, cette étude démontre la non réversibilité du phénomène, compte tenu de la persistance de souches résistantes dans des élevages non exposés depuis plusieurs mois. De même, une étude de cohorte, réalisée aux Etats-Unis (Welton et al., 1998), sur les effets d'une exposition de dindes à la virginiamycine, à des doses sub-thérapeutiques, rapporte une augmentation de la résistance à l'égard de l'association quinupristine/dalfopristine, associée avec l'âge des animaux ; les auteurs suggèrent une corrélation positive avec le temps d'exposition à l'antibiotique.

La relation épidémiologique entre l'utilisation de l'avilamycine dans un lot de poulet et la résistance à l'avilamycine chez la souche d'*Enterococcus faecium* isolée aléatoirement de ce lot, a été analysée à l'aide des données recueillies sur la consommation d'antibiotiques dans le cadre du programme de surveillance français. Une étude cas-témoin a démontré (Chauvin et al., 2005b) que le risque relatif de sélectionner une souche résistante à l'avilamycine sur un lot ayant reçu l'antibiotique est de 2,3 avec un intervalle de confiance de 1,2 à 4,3 (p<0,01).

La plupart des critères pour considérer que l'association statistique est valide selon les postulats de Hill sont atteints dans cette étude. Une association forte a été observée entre la consommation d'avilamycine sur les lots et le portage de souches d'*E. faecium* résistantes à l'avilamycine. L'association est plausible au plan biologique et est compatible avec la séquence des événements. Le dernier critère qui est la relation dose-effet et notamment la relation entre la durée d'exposition du lot avec la probabilité d'isoler une souche résistante n'a pas été vérifié. Cette vérification suppose une taille d'échantillons plus importante. Cette étude est compatible avec différentes études danoises (Aarestrup, 1998; Aarestrup et al., 2000a).

### **2.3. Etude de l'impact sur les bactéries pathogènes vétérinaires**

La revue de la littérature publiée indique que de nombreuses études concernent les effets des antibiotiques sur les bactéries d'origine animale, mais qu'en revanche peu d'entre elles traitent des effets sur les bactéries pathogènes vétérinaires.

#### *- Etudes descriptives*

La résistance bactérienne peut être appréciée pour des bactéries pathogènes animales, isolées de cas cliniques.

Dans le cadre du programme DANMAP, relatifs aux impacts des antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance, ou comme médicaments vétérinaires, Aarestrup et al. (Aarestrup et al., 1998c) concluent que les taux de résistance les plus élevés peuvent être observés chez les entérocoques et les *E. coli* pathogènes (Aarestrup et al., 1998b). Les taux de résistance observés chez les staphylocoques pathogènes se sont révélés moins élevés. Cette différence pourrait être due à une moindre exposition aux antibiotiques dispensés par voie orale, de ces bactéries présentes sur la peau des animaux.

Pour ce qui concerne les *E. coli* pathogènes, les taux de résistance les plus élevés sont généralement observés en filière porcine, par rapport à la filière bovine, sauf vis à vis des bêta-lactamines et de la gentamicine (Aarestrup et al., 1998b). Les taux de résistance à l'ampicilline obtenus pour cette population bactérienne étaient de 80% chez le veau, contre 19% chez le porc. Les auteurs attribuent cette différence au fait que les veaux de moins de 2 mois représentent une population à risque pour les diarrhées à *E. coli* et sont donc plus fréquemment exposés au traitement antibiotique. Pour la gentamicine, des différences similaires ont été obtenues, alors que cet antibiotique n'est autorisé que pour la diarrhée du porcelet au Danemark. Cette observation conduit les auteurs à supposer un éventuel mésusage de la gentamicine chez le veau (Aarestrup et al., 1998b).

En France, pour la filière bovine, les résultats de surveillance de la résistance des bactéries pathogènes d'origine animale permettent de disposer d'informations

sur une période supérieure à une dizaine d'année et ont permis l'étude de l'émergence de nouveaux phénotypes de résistance et de leur évolution au cours du temps (cf. §1.1 de cette section).

**- Etudes expérimentales**

Les expériences de Allen et al. (Allen et al., 1992) consistent à étudier l'effet de traitement antibiotique chez le veau atteint d'infection respiratoire. Les résultats démontrent une résistance à la pénicilline, l'ampicilline et aux tétracyclines, en relation avec le traitement, chez des souches de *Mannheimia haemolytica* isolées d'animaux malades. Ce résultat n'est pas obtenu pour *Pasteurella multocida*.

**- Etudes étiologiques**

L'association entre l'usage des antibiotiques et la sensibilité de *S. aureus*, pathogène majeur des infections intramammaires, a été démontrée en élevage de vaches laitières (Tikofsky et al., 2003). Dans cette étude, les taux de résistance de *S. aureus* étaient significativement supérieurs à plusieurs antibiotiques (ampicilline, tétracycline et pénicilline) en élevage conventionnel par rapport à des élevages de type « bio », considérés comme groupe témoin du fait d'une pression de sélection nulle.

**3. Effet d'un arrêt de l'usage d'un antibiotique**

Ce chapitre illustre les conséquences de l'arrêt de l'usage de certaines molécules antibiotiques sur la résistance bactérienne selon les espèces animales.

Les interdictions émises quant à l'utilisation de facteurs de croissance constituent à ce titre des situations privilégiées pour étudier cet impact. Ainsi, les études publiées peuvent faire référence à l'arrêt de l'utilisation au Danemark, de l'avoparcine (en 1995), de la virginiamycine (en 1998) et de tous les autres facteurs de croissance antibiotiques (volontairement, depuis début 1999) (Aarestrup et al., 2001b), ou encore aux interdictions de la Communauté européenne depuis 1997 pour l'avoparcine et 1999 pour la virginiamycine, la bacitracine zinc, la spiramycine et le phosphate de tylosine. L'avenir devrait constituer également une période de transition présentant le même type d'intérêt, avec la suppression définitive, en Europe, de tous les antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance fin 2005.

Le lien de cause à effet n'est pas toujours immédiat et/ou direct.

L'arrêt des usages des antibiotiques ne s'accompagne pas toujours d'une réduction immédiate de la résistance bactérienne.

Dans les années 1980, Langlois et al. (Langlois et al., 1983) avaient mis en évidence, dans des élevages de truies, qu'un arrêt de l'utilisation des antibiotiques ne s'accompagnait pas d'une réduction significative du taux de résistance, et ce, jusqu'à 126 mois après l'arrêt.

Dans le cadre de la surveillance des programmes danois, la baisse initiale de la résistance à la virginiamycine, chez le porc (8% en 1999), a suivi l'arrêt de l'utilisation de cet additif, mais en 2000 un clone d'*E. faecium* résistant à la tétracycline, à la pénicilline, à l'érythromycine, à la virginiamycine a diffusé et entraîné une hausse du pourcentage de souches résistantes aux streptogramines (24% en 2000) ; pour des raisons inconnues, ce clone n'a pas persisté les années suivantes.

Chez le poulet, (Emborg et al., 2004), la probabilité d'isoler une souche résistante à la virginiamycine reste élevée dans des élevages de poulets, plus d'un an après la dernière prise de cet antibiotique. Ce dernier phénomène serait associé à l'émergence de souches ayant une résistance croisée entre les bêta-lactamines et la virginiamycine, sélectionnée par l'usage thérapeutique de bêta-lactamines (Emborg et al., 2004). Cette observation a également été faite dans le cadre des travaux de surveillance danois : la réduction de la prévalence de la résistance à la virginiamycine a suivi, l'arrêt d'utilisation des streptogramines comme additifs alimentaires, mais depuis 1999, le taux de souches résistantes reste relativement élevé (28-25% en 2002 ou 2003) du fait de phénomènes de co-sélection des souches par une utilisation importante des pénicillines.

En 1998, les taux de résistance à la vancomycine observés au Danemark, restent élevés chez *E. faecium* isolés de poulets et de porcs, malgré l'interdiction d'utiliser l'avoparcine (Aarestrup et al., 1998c). A cette époque, les auteurs avaient émis comme biais possible, l'interprétation des résultats exprimés sous la forme de taux de résistance ; ils suggéraient d'une part que la prévalence (nombre d'animaux porteurs de la résistance) avait du être réduite plusieurs mois après l'interdiction de l'avoparcine et d'autre part que le taux de colonisation d'*E. faecium* résistant à la vancomycine avait été réduit chez les animaux porteurs. L'évolution de la surveillance de cette résistance au cours des années suivantes s'est traduite par une baisse du taux de résistance chez le poulet, passant de 72,7%, en 1995, à 5,8%, en 2000 (Aarestrup et al., 2001b). Cette évolution a été plus lente chez les souches isolées de la flore intestinale du porc ; ceci est probablement lié à des phénomènes de co-sélection par d'autres antibiotiques (macrolides) ou par des additifs alimentaires (cuivre) pour lesquels les gènes de résistance sont portés sur le même plasmide (Hasman et al., 2002); outre les phénomènes de co-résistance, la résistance aux glycopeptides est observée en filières aviaire et porcine jusqu'à 6 ans après l'interdiction de l'avoparcine (Aarestrup et al., 2001b).

Ces dernières observations sont concordantes avec les résultats des travaux allemands qui démontrent une réduction de la prévalence de la résistance à la vancomycine en filière aviaire, suite à l'interdiction d'utiliser l'avoparcine (Klare et al., 1999). Le même phénomène est observé chez le poulet à l'égard d'autres facteurs de croissance (Aarestrup et al., 2001b) ou dans la viande de

poulet destinée à la consommation humaine (Emborg et al., 2003). Emborg et al. (Emborg et al., 2004) ont démontré par ailleurs que la probabilité d'isoler des entérocoques résistants à 3 facteurs de croissance (avilamycine, erythromycine, virginiamycine) diminuait avec le temps séparant l'analyse microbiologique de la dernière utilisation de l'antibiotique.

**Les conséquences de l'interdiction des facteurs de croissance peuvent également être opposées à celles attendues.**

En France, les travaux de Desmots et al. (Desmots et al., 2004) démontrent une augmentation des taux de résistance de *C. coli* en filière aviaire, entre 1992-1996 et 2001-2002, notamment vis à vis des quinolones, de la tétracycline et des macrolides. Outre les biais relatifs à l'étude elle-même (échantillonnage, période de prélèvement proche de la date de l'interdiction), les auteurs attirent l'attention sur de possibles augmentations des usages des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire (dont les tétracyclines, les macrolides et les fluoroquinolones) consécutifs à l'arrêt des facteurs de croissance.

De même, l'arrêt de la tylosine, comme additif, n'a pas été suivi d'une réduction significative des entérocoques résistants aux glycopeptides, chez le porc, du fait d'une utilisation maintenue de cette molécule en tant que médicament vétérinaire. Cette utilisation s'explique par l'augmentation de l'incidence des entérites chez le porc dues à *Lawsonia intracellularis* et *Brachyspira hyodysenteriae* nécessitant la mise en place de traitements à l'engraissement.

Les données françaises de surveillance obtenues depuis une vingtaine d'années ont permis d'évaluer les conséquences en filière bovine du retrait du chloramphénicol au niveau de la résistance des *E. coli*. En 1994, le chloramphénicol a été retiré du marché. Son analogue fluoré, le florfénicol, a été mis sur le marché à partir de 1995. L'étude de la résistance au chloramphénicol et au florfénicol, de 1982 à 2002, et des gènes responsables de ces résistances, montre que le retrait du chloramphénicol a eu peu de conséquences sur la résistance des *E. coli* d'origine bovine vis-à-vis de cet antibiotique. Le pourcentage de souches résistantes a diminué mais la population résistante reste cependant majoritaire. Ces résultats pourraient être dus à des résistances croisées entre le chloramphénicol et le florfénicol (Schwarz et al., 2004).

Ces différents exemples soulignent le fait qu'il n'est pas toujours aisé de prédire l'évolution d'un taux de résistance après l'arrêt d'utilisation d'une famille d'antibiotiques.

De nombreux phénomènes (coût biologique de la résistance, co-sélection par d'autres antibiotiques ou d'autres anti-infectieux, caractère épidémique ou non de certains clones ou gènes de résistance, report de consommation d'antibiotiques vers d'autres familles...) peuvent influencer l'évolution de la résistance. Il est également important de souligner que la suppression de l'usage des antibiotiques ne s'accompagne pas toujours de la disparition immédiate des résistances associées.

#### 4. Limites et perspectives des travaux épidémiologiques

Aucune étude étiologique n'est exempte de biais. Ils constituent des sources de variabilité et d'erreurs en épidémiologie qu'il importe d'analyser, de prendre en compte ou d'éviter pour ceux qui peuvent l'être, lors de l'interprétation des résultats.

##### **4.1. Biais de sélection**

Les biais de sélection portent sur les différences entre l'échantillon analysé et la population source. Ils conduisent à une vision déformée de la population source et/ou de la population cible indépendamment de la précision des mesures (Bouyer et al., 1995).

Les biais de sélection peuvent également concerner la constitution des groupes tests et témoins qui doivent être comparables.

##### Etudes descriptives

Les études descriptives répondent à deux enjeux différents :

- le premier est un enjeu qui porte sur les élevages (connaître et suivre la dynamique de la résistance bactérienne au sein de ces populations avec la perspective de pouvoir évaluer l'impact des actions visant à maîtriser le phénomène) ;
- le deuxième enjeu porte sur une quantification au plus près du consommateur, ceci dans une perspective sanitaire.

Bien qu'il soit vraisemblable que le second dépende du premier, il est frappant d'observer que les études descriptives sont peu explicites sur ce sujet et ne précisent pas toujours dans quelle perspective elles se situent.

Le biais de sélection concerne ici principalement la représentativité de l'échantillon, élément déterminant des possibilités d'extrapolation des résultats à la population source qui correspond à la population sur laquelle porte l'objectif du travail. Les études descriptives reposent en majorité sur le programme DANMAP. Elles fonctionnent avec un échantillonnage aléatoire des carcasses de porcs, poulets et bovins en abattoir ainsi qu'avec un échantillon d'antibiogrammes provenant de laboratoires d'analyses vétérinaires correspondant à des prélèvements réalisés en élevage par les vétérinaires de

terrain en cas de pathologie ou d'échec thérapeutique. On peut identifier 2 biais importants :

- d'une part, le prélèvement en abattoir conduit à n'échantillonner que les animaux sains (sous-estimation du risque) ;
- d'autre part, l'échantillonnage de prélèvements envoyés aux laboratoires conduit à ne considérer que les animaux atteints de maladies graves et probablement d'échecs thérapeutiques. De plus, les petits abattoirs sont souvent exclus de l'échantillon. L'échantillonnage de produits animaux dans les points de vente au détail conduit au même type de biais que les abattoirs (Klare et al., 1999).

### Essais cliniques

Les biais de sélection ne portent pas ici sur une déformation possible de l'image de la population source (puisque'il ne s'agit pas d'extrapoler les résultats à la réalité), mais sur la constitution des groupes contrôles et des groupes tests.

S'il existe des différences systématiques entre les groupes, les résultats peuvent être affectés. D'où l'importance d'un choix aléatoire des individus affectés à chacun des groupes dans l'ensemble des individus recrutés pour l'essai, ce qui permet d'assurer l'égalité des contextes entre les individus. Parmi les travaux examinés, si tous les essais cliniques sont contrôlés (présence d'un groupe contrôle), tous ne comportent pas de tirage au sort (essais contrôlé randomisé).

### Etudes étiologiques

La population source est, comme souvent dans les études étiologiques, mal définie dans nombre des travaux. Dans les faits, il s'agit, suivant les travaux, des animaux issus d'élevages dits conventionnels ou intensifs (notamment en filières porcine et aviaire) ou des animaux issus d'élevages n'utilisant pas d'antibiotiques, dont les élevages biologiques.

On retrouve souvent dans ces études étiologiques un recrutement d'élevages industriels qui ne reflète qu'une partie de l'élevage des différents pays. Des biais peuvent porter sur le choix des élevages tests et témoins dans des régions différentes ou le choix d'espèces différentes entre les groupes tests et témoins (Siegel et al., 1974). Ils peuvent également porter sur un échantillonnage différentiel selon les groupes d'animaux étudiés où l'échantillonnage est plus important pour les animaux exposés aux antibiotiques thérapeutiques par rapport aux autres groupes d'animaux (**Gellin et al., 1989**).

Le problème du biais de sélection est difficile à analyser en raison d'une part de la mauvaise définition des populations source, et d'autre part de l'absence d'explication concernant les modalités de choix des éléments de l'échantillon, élevages ou animaux.

### Etudes interventionnelles

On retrouve ici les mêmes problématiques que dans les études étiologiques. Deux travaux sont illustratifs de ce type de biais.

Dans l'étude de Langlois et al. (Langlois et al., 1978b), les troupeaux considérés ont des statuts sanitaires différents. L'un d'eux est un troupeau dit « pathogen free » donc indemne d'un certain nombre de maladies. De plus, les races sont différentes. Il s'agit ici d'un biais de sélection portant sur la comparabilité des groupes test et témoins. La portée des résultats en est amoindrie. Les travaux d'Emborg et al. (Emborg et al., 2003) portant sur la résistance dans les carcasses et les produits carnés de poulet au Danemark ont inclus des produits animaux d'origine non danoise, mais aucune carcasse non danoise. On a donc ici un biais dans le recrutement des échantillons qui peut conduire à une surestimation du risque pour les produits animaux, les facteurs de croissance étant encore utilisés dans la plupart des pays.

On constate ici que le choix des élevages sondés est rarement motivé et concerne la plupart du temps un type d'élevage bien spécifique ou une région géographique restreinte, le côté « pratique » semblant l'emporter sur la rigueur. De plus, le choix des groupes témoins n'est pas toujours approprié. L'étude d'Avrain et al. (Avrain et al., 2003) fait ici figure d'exception avec les études issues du programme DANMAP, l'échantillon étant représentatif de l'ensemble des élevages du fait de l'obligation d'abattre les animaux en abattoir ; mais ces travaux souffrent d'un biais venant du fait que seuls les animaux sains sont abattus en abattoirs.

### **4.2. Biais de classement**

Les biais de classement portent sur la mesure de l'exposition ou de la résistance. Un biais de classement conduit à une erreur de classement des individus portant sur l'exposition aux antibiotiques (variable explicative) ou la résistance bactérienne (variable expliquée), indépendamment de la représentativité de l'échantillon.

Les biais de classement peuvent être différentiels ou non. Un biais différentiel, est un biais qui atteint préférentiellement l'une des modalités de la variable considérée (les exposés plutôt que les non exposés ou les résistants plutôt que les sensibles) (Bouyer et al., 1995).

### Etudes descriptives

Les principaux biais de classement des études descriptives portent à la fois sur la mesure d'exposition, dans la mesure où les quantités d'antibiotiques consommés par filière ne sont pas connues, et sur la résistance des bactéries, du fait de la participation de différents laboratoires d'analyse pouvant générer des résultats différents.



### Etudes cliniques

Le problème principal de ce type d'étude est la rigueur de l'isolement des animaux tests et témoins et de leur nourriture, afin d'écartier toute contamination interindividuelle des animaux par des bactéries résistantes ou toute contamination de l'aliment blanc par l'aliment supplémenté en antibiotique. De plus, dans la plupart des études concernant les facteurs de croissance, les animaux reçoivent l'aliment supplémenté à volonté, ce qui ne permet aucun contrôle des quantités ingérées. Enfin, le stress lié au transport des animaux peut être cité (Langlois et al., 1978; Dawson et al., 1983; Dawson et al., 1984) comme un biais susceptible d'augmenter la valeur de la résistance.

### Etudes étiologiques et interventionnelles

Comme dans les études cliniques, pour tous les travaux avec aliment supplémenté en antibiotique fourni à volonté, la quantité ingérée étant non mesurée, il est impossible de connaître la dose d'exposition.

En liaison avec le caractère rétrospectif du recueil des données concernant l'exposition aux antibiotiques, des biais d'information sont constatés, relatifs à la qualité des données d'utilisation des antibiotiques dans les exploitations (Aarestrup et al., 2000a) ou à des différences entre les traitements achetés et effectivement utilisés (Bager et al., 1997; Dunlop et al., 1998b).

De plus, certaines études présentent un traitement différent entre échantillons lié à la participation de plusieurs laboratoires d'analyse, à un changement de méthode de calcul (Linton et al., 1988) ou de détection de la résistance, et certains sont même liés au statut d'exposition de l'échantillon, créant ainsi un biais différentiel.

### **4.3. Biais de confusion**

Un biais de confusion correspond à l'influence d'un tiers facteur sur l'association entre exposition et résistance qui empêche d'avoir accès à la relation propre et conduit à une sous ou une sur-évaluation de cette relation (Bouyer et al., 1995).

Les biais de confusion sont les seuls biais dont on peut analyser l'effet sur la relation entre exposition et résistance. Certains des articles prennent en compte dans leur analyse un certain nombre de biais au travers de la modélisation (régression logistique, analyse de variance, modèle mixte,...).

Parmi les biais qui persistent sans être analysés, deux se retrouvent quel que soit le type d'étude :

- 1 - l'hygiène des exploitations : une exploitation qui maîtrise au mieux l'hygiène risque d'être moins consommatrice d'antibiotiques et de limiter les phénomènes de contamination interindividuelle ou inter-bandes par des bactéries résistantes (notamment par le système de vide sanitaire entre deux bandes d'animaux) ;

2 - les phénomènes d'équilibre de populations bactériennes qui peuvent agir comme des biais de confusion : certaines espèces de bactéries sont plus fréquemment porteuses de résistance, or certains antibiotiques agissent sur l'équilibre des populations bactériennes indépendamment de leur niveau de résistance (sélection d'*E. faecium* au dépend d'*E. faecalis* et *gallinarum* par exemple). Ils sélectionnent ainsi indirectement les résistances portées de façon privilégiée par l'espèce bactérienne qu'ils favorisent.

#### **4.4. Valeur quant à l'inférence biologique**

Association entre usage et résistance bactérienne

Les études cliniques permettent de mettre en évidence une relation forte entre l'exposition et la résistance bactérienne, que l'usage correspondent à une posologie thérapeutique (Allen et al., 1992; DePaola et al., 1995), ou à une posologie correspondant à un additif facteur de croissance (Welch et al., 1979; Christie et al., 1983; Robredo et al., 1999; Donabedian et al., 2003; Langford et al., 2003). Cette relation est également démontrée par des études épidémiologiques portant sur les deux types d'usages, facteurs de croissance (Aarestrup et al., 2000a) (Siegel et al., 1974; Bager et al., 1997) et/ou usages thérapeutiques (Linton et al., 1988; Gellin et al., 1989; Tikofsky et al., 2003).

Les études portant sur l'effet des doses thérapeutiques démontrent un effet significatif de l'exposition sur l'augmentation de la résistance des populations bactérienne à la molécule administrée, qu'il s'agisse de cyclines (Stabler et al., 1982; Hinton et al., 1986; DePaola et al., 1995), de macrolides (Hinton et al., 1986; Kaukas et al., 1987), de pénicillines (Allen et al., 1992), de quinolones (McDermott et al., 2002; Humphrey et al., 2005) ou d'aminosides (Chaslus-Dancla et al., 2000). Si cette association se traduit, par exemple, par des taux de résistance généralement plus élevés dans des élevages conventionnels par rapport à des élevages biologiques moins exposés aux antibiotiques, il est intéressant de noter que Tikofsky (Tikofsky et al., 2003) observe un taux de résistance de *S. aureus* à l'érythromycine (antibiotique important en thérapeutique humaine) similaire entre ces deux types d'élevage. Ce résultat pourrait être lié à la persistance dans les élevages biologiques d'un effet résiduel des antibiotiques administrés avant la certification (en cohérence avec l'hypothèse d'un effet à long terme des facteurs de croissance) effet qui peut être entretenu par une exposition aux antibiotiques autorisés une à deux fois par an et par animal en agriculture biologique.

Les études concernant les facteurs de croissance portent majoritairement sur les entérocoques ou sur un ensemble de bactéries entériques (coliformes, Gram -, ...) et les antibiotiques d'exposition sont la tylosine, l'avoparcine, l'avilamycine, la virginiamycine, la tétracycline, la bacitracine et l'olaquinox, molécules qui sont toutes interdites en Europe depuis au moins 5 ans, à l'exception de l'avilamycine. L'étude de Linton et al. (Linton et al., 1988)

apporte un argument particulièrement fort sur la force d'association entre l'usage d'antibiotique et la résistance, en démontrant une relation chronologique entre l'introduction chez le porc d'un nouveau facteur de croissance, l'olaquinox, et l'émergence de la résistance associée.

Quant aux résistances multiples, certains auteurs constatent une sélection des résistances multiples plus particulièrement par des doses thérapeutiques et al., (Gellin 1989); d'autres, inversement, estiment que les agents thérapeutiques antibiotiques ne sélectionnent pas de résistances multiples (Kaukas et al., 1987).

### Réversibilité

Des arguments forts en faveur de la causalité de la relation entre l'usage et la résistance bactérienne relèvent de la réversibilité des effets ; ce qui revient à étudier si un retrait de l'exposition aux antibiotiques est associé à une diminution de la résistance, même si celle-ci n'est que partielle.

Trois types d'études disponibles permettent d'étudier le caractère réversible de l'effet des antibiotiques sur la résistance bactérienne :

- les études portant sur l'arrêt d'un antibiotique facteur de croissance,
- les études portant sur l'arrêt de l'ensemble des facteurs de croissance (situation du Danemark),
- les études portant sur l'arrêt de tout ou partie des antibiotiques pour un troupeau expérimental.

Peu d'études expérimentales ont été mises en œuvre pour l'étude de la réversibilité d'un traitement antibiotique. Les travaux de De Paola ont démontré dans ce domaine, chez le poisson chat, une réversibilité de la résistance bactérienne à un traitement à doses thérapeutiques par une tétracycline (DePaola et al., 1995). L'étude de Robredo et al., sur des poulets exposés à l'avoparcine en tant qu'additif (Robredo et al., 1999), évoque un effet transitoire de cet antibiotique sur la résistance aux glycopeptides lié à la prolifération de souches sensibles en l'absence de pression sélective.

Pour ce qui relève des études réalisées dans un contexte d'interdiction d'usage des facteurs de croissance, les résultats sont généralement en faveur d'une diminution de la résistance bactérienne observée chez l'animal suite à l'arrêt de ces antibiotiques (Pantosti et al., 1999; Boerlin et al., 2001; Emborg et al., 2004) , voire à une probabilité moindre d'isoler des bactéries résistantes sur les aliments d'origine animale (Emborg et al., 2003). La diminution peut être rapide (macrolides et lincosamides suite à l'arrêt de la tylosine (Boerlin et al., 2001) ou beaucoup plus lente (résistance à la tétracycline suite à l'arrêt total des antibiotiques : (Langlois et al., 1978b);(Langlois et al., 1983). Cependant, cette relation n'a pas été observée par l'équipe de Kruse, en élevage de poulets, un an et demi après l'interdiction de l'avoparcine (Kruse et al., 1999).

L'aspect transitoire de cet effet réversible est variable, avec un délai de retour « à la normale » de plusieurs semaines (DePaola et al., 1995; McDermott et al.,

2002), à quelques jours (Kaukas et al., 1987). Les résistances semblent cependant ne jamais disparaître complètement, que ce soit en termes de taux de résistance ou de taux de prévalence (Langlois et al., 1978b; Bager et al., 1999; Kruse et al., 1999; Boerlin et al., 2001; Emborg et al., 2003; Emborg et al., 2004). Les raisons principales évoquées à cette observation sont liées à des phénomènes de co-sélection, à l'hygiène avec la possibilité de contamination par l'environnement et à des « piqûres de rappel » thérapeutiques, quand l'antibiotique supprimé est un facteur de croissance dont l'utilisation thérapeutique reste autorisée.

L'argument de la réversibilité est d'autant plus fort que plusieurs de ces études raisonnent en prévalence (Klare et al., 1999; Pantosti et al., 1999; Emborg et al., 2004).

Il importe de souligner cependant que les mécanismes impliqués ont une importance dans le caractère réversible, ou non, de la résistance des souches, même après la suppression de la pression de sélection. Ceci est par exemple illustré par la persistance de souches de *Campylobacter* résistantes aux fluoroquinolones, générée par une mutation du gène *gyrA* (Zhang et al., 2003).

#### Effet dose

En ce qui concerne la mise en évidence d'un effet dose, les travaux de Langford démontrent un effet proportionnel entre la dose d'antibiotiques contenue dans le lait administré par voie orale à de jeunes veaux et le caractère résistant de la flore bactérienne intestinale (Langford et al., 2003). En revanche concernant les études portant sur la hiérarchisation des effets respectifs des doses thérapeutiques et subthérapeutiques sur la résistance, les résultats peuvent diverger : les facteurs de croissance peuvent être associés à un effet supérieur sur la résistance par rapport aux agents thérapeutiques (**Gellin et al., 1989**); inversement l'effet des agents thérapeutiques a été estimé supérieur à celui des facteurs de croissance par Dawson et al. (Dawson et al., 1984). Cette opposition peut être expliquée notamment par certains biais d'exposition ou de classement cités précédemment. Le faible nombre des animaux observés (d'où une perte de puissance des analyses statistiques) et le mauvais isolement des animaux (possibilité de contamination croisée des individus par des bactéries résistantes) peuvent également expliquer ces divergences.

#### Modification des équilibres microbiologiques

L'association entre l'usage des antibiotiques et la résistance bactérienne doit également prendre en considération des équilibres écologiques de microflore. Ainsi, par exemple, l'étude de Kaukas (Kaukas et al., 1987) évoque le biais lié aux modifications des populations bactériennes qui permet de comprendre pourquoi une exposition à l'ampicilline semble avoir un effet contradictoire en diminuant la résistance à la tylosine ; ceci serait dû à la suppression des *E.*

*faecium* par l'ampicilline, principales bactéries porteuses de résistance à la tylosine parmi les entérocoques.

## **5. Conséquences indésirables**

### **5.1. Santé animale**

Les antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance, ont également un effet sur la barrière intestinale et le contrôle de populations bactériennes notamment anaérobies de la flore intestinale des animaux. Dans plusieurs pays, l'arrêt d'utilisation a été suivi du développement de maladies intestinales chez le porc et la volaille.

En Suède, la différence en termes de productivité, observée chez le porc après l'arrêt des facteurs de croissance, n'a pas été totalement annulée plus de 15 ans après (Wierup, 2001). Au Danemark, une morbidité et une mortalité accrues ont été enregistrées chez le porc du fait d'infections intestinales avec un accroissement des diarrhées chez les porcs à l'engrais et le développement d'infections chroniques à *Lawsonia intracellularis*. Ces maladies ont entraîné une réduction de la vitesse de croissance et une augmentation de la mortalité a été enregistrée. Au Royaume-Uni, un accroissement du syndrome dermatite-néphrite et du syndrome d'amaigrissement du porcelet a été observé entre 1999 et 2000 (Directorate., 2002). Chez les poulets, une augmentation des entérites nécrotiques à clostridies a été observée au Danemark dès 1998 (DANMAP, 1998; Tornee, 2002) et en France avec un doublement de la prévalence en 1999 (Afssa-a, 2002). Des problèmes au niveau des pattes et de la peau des volailles ont été également rapportés en augmentation depuis la fin des années 1990 au Danemark (Petersen, 2002) .

Cependant, d'un point de vue épidémiologique, il est difficile de séparer les maladies qui seraient en rapport avec le retrait des additifs avec le développement naturel de maladies infectieuses d'origine virale sans rapport avec ce retrait ou des changements de pratiques zootechniques (retrait des farines animales, changements alimentaires...).

#### **A retenir**

Le bilan des études publiées portant sur l'impact de l'usage des antibiotiques sur la résistance bactérienne chez l'animal, indique que la majorité des résultats sont issus d'études descriptives. De nombreux travaux sont issus des plans de surveillance descriptifs danois, démarrés en 1995 ; ce programme est le premier à étudier systématiquement la résistance aux antibiotiques utilisés à la fois comme facteurs de croissance et comme additifs, parallèlement à ceux utilisés comme médicaments vétérinaires (il a été associé depuis 2002 à une surveillance équivalente chez l'homme).

Quant au peu d'études étiologiques et interventionnelles, il est fait le constat d'une relative faiblesse méthodologique des travaux en ce qui concerne les aspects épidémiologiques. En effet, il est dommage que peu de ces travaux utilisent des mesures de risque et d'association rigoureuses (taux de prévalence et risque relatif pour les études de cohorte) et que peu de travaux étiologiques soient des études de cohorte prospective, qui est le protocole le plus puissant pour évaluer l'association entre un facteur de risque et une maladie (ici la résistance). Quant aux biais, ils sont certes inévitables dans les études épidémiologiques qui sont des études de terrain dans lesquelles on ne peut maîtriser tous les paramètres, mais il est possible et nécessaire de prévoir et prévenir les biais qui peuvent l'être.

S'il existe un faisceau de preuves au sens de Hill, qui tend à confirmer la nature causale de l'association entre exposition aux antibiotiques et résistance chez l'animal, l'association considérée dans la grande majorité des travaux est exprimée en taux de résistance et non en taux de prévalence. Il est donc difficile de conclure sur les risques pour l'homme quand on considère que la progression de la résistance dans les populations est le résultat de l'interaction entre l'exposition aux antibiotiques et la transmission inter-individuelle des bactéries résistantes.

Il importe également de souligner le caractère multifactoriel du phénomène d'acquisition et de diffusion de la résistance aux antibiotiques dans des populations bactériennes chez les animaux d'élevage ; parmi les nombreux facteurs, les modalités d'usage des antibiotiques spécifiques des filières animales, des types de production, des pays, les caractéristiques écologiques de la microflore des animaux, les mécanismes de résistances croisées, et les facteurs environnementaux (maîtrise de l'hygiène notamment) ont un rôle déterminant.

## **5.2. Consommation d'antibiotiques**

L'accroissement de l'usage d'antibiotiques après l'arrêt des facteurs de croissance a été observé dans tous les pays ayant un suivi de la consommation des antibiotiques. Au Royaume Uni (Directorate., 2002), la quantité totale d'antibiotiques utilisés comme médicaments vétérinaires est passée de 383 à 437 tonnes entre 1999, date de l'arrêt et 2000. Cette augmentation est due à un accroissement de l'utilisation des tétracyclines (+36 t), des sulfamides et du triméthoprime (+12 t) et des macrolides (+12 t).

Au Danemark, la quantité d'antibiotiques utilisée comme médicament vétérinaire a doublé entre 1996 (DANMAP, 1997) et 2001 (DANMAP, 2002). Les antibiotiques ayant subi une augmentation sont ceux principalement utilisés chez le porc, les tétracyclines (de 13 à 28 t), les macrolides et lincosamides de 7,6 à 14,3 tonnes et les aminoglycosides de (7 à 12 t). Cette augmentation a eu lieu malgré les efforts réalisés pour s'adapter à l'arrêt des facteurs de croissance.

Elle est due au développement de nouveaux syndromes pathologiques en production porcine et est également imputable au développement du syndrome d'amaigrissement du porcelet de son cortège de complications.

Le même phénomène d'augmentation de la consommation d'antibiotiques à titre thérapeutique avait été observé en Suède après l'arrêt des facteurs de croissance (Wierup, 2001).

Les données françaises montrent également une augmentation de l'utilisation des macrolides pour maîtriser les nouveaux syndromes pathologiques en élevage porcin.

### **5.3. Influence sur les plasmides de résistance aux antibiotiques**

Le flavophospholipol (bambermycin, ou moenomycin) est un antibiotique glycolipidique phosphoré utilisé comme facteur de croissance et qui n'est apparenté à aucune famille antibiotique utilisée en médecine vétérinaire et humaine. Cette molécule inhibe la synthèse du peptidoglycane mais aucune résistance croisée n'existe avec la famille des bêtalactamines. Un effet d'« élimination des plasmides » chez *Escherichia coli* et d'autres membres de la famille des entérobactéries a été décrit pour cette molécule (Brana et al., 1974; Crawford, 1984). L'effet est une inhibition sélective de la croissance bactérienne de cellules hébergeant certains plasmides. La CMI du flavophospholipol chez *E. coli* est normalement supérieure à 64 µg/ml mais pour certaines souches hébergeant des plasmides, la CMI est comprise entre 0,125 et 5 µg/ml (Mitsubishi et al., 1970). Cette effet inhibiteur existe vis-à-vis de certaines souches porteuses de plasmides R, mais pas sur d'autres (Sokol et al., 1973; George et al., 1984). *In vitro*, le flavophospholipol réduit la fréquence de transfert de certains plasmides R (Lebek, 1971). Dans un modèle souris, Corpet a démontré une réduction significative du nombre de *E. coli* résistants à la tétracycline chez les animaux recevant du flavophospholipol (Corpet, 1984). Chez des études chez le porc et le veau, portant sur des nombres limités d'animaux recevant des aliments supplémentés en flavophospholipol, une diminution de la fréquence de la résistance à l'ampicilline, aux tétracyclines, à la streptomycine et aux sulfamides est observée chez les *E. coli* fécaux (Dealy et al., 1976; Dealy et al., 1977). Chez le porc, une réduction significative de la prévalence et du portage de *E. coli* résistants a été observée (van den Bogaard et al., 2002b) chez le groupe recevant du flavophospholipol comme additif par rapport au groupe témoin non traité et au groupe supplémenté avec de l'avoparcine. Aucun effet n'a été observé dans ce groupe en ce qui concerne la prévalence de la résistance chez les entérocoques tandis que le taux de résistance à la vancomycine augmentait significativement chez le groupe recevant de l'avoparcine (van den Bogaard et al., 2002b).

# Conclusion



Comme tout être vivant, les animaux sont sujets à des maladies qu'il est nécessaire de prévenir ou de traiter. Dès lors qu'un animal est sujet à une infection bactérienne, il doit recevoir un antibiotique car seuls des animaux sains peuvent fournir des denrées alimentaires sans risque pour la santé du consommateur. Par ailleurs, l'éthique impose de prendre en charge un animal malade, pour son bien-être. L'administration d'antibiotiques se fait sous contrôle vétérinaire et sur prescription.

Le vétérinaire a une place centrale dans la maîtrise de l'utilisation des antibiotiques en santé animale. Il intervient notamment au stade de la conception, du développement, de l'autorisation de mise sur le marché du médicament vétérinaire antibiotique, mais aussi et surtout dans sa distribution, son administration ainsi que dans le contrôle des bonnes pratiques de son utilisation.

Les antibiotiques sont des médicaments qui doivent être perçus comme un véritable bien public faisant partie du patrimoine de santé. Pour cette raison, leur utilisation doit se faire de manière prudente et raisonnée.

Les antibiotiques sont des médicaments capables d'entraîner la destruction (effet bactéricide) ou l'arrêt de la multiplication (effet bactériostatique) des micro-organismes. A partir d'une certaine concentration ou au bout d'un certain temps, les antibiotiques permettent d'assurer efficacement et en toute sécurité, le contrôle de nombreuses bactéries pathogènes à l'origine des maladies dites infectieuses humaines et animales. Ils n'ont en revanche aucune action contre les virus.

# Bibliographie

- Aarestrup, F. M. (1998). "Association between decreased susceptibility to a new antibiotic for treatment of human disease, everninomycin (sch 27899), and resistance to an antibiotic used for growth promotion in animals, avilamycin." *Microb Drug Resist* 4(2): 137-141.
- Aarestrup, F. M., F. Bager, et al. (2000). "Association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers: epidemiological study and changes over time." *Microb Drug Resist* 6(1): 71-5.
- Aarestrup, F. M., F. Bager, et al. (1998). "Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP)." *Apmis* 106(8): 745-70.
- Aarestrup, F. M., F. Bager, et al. (1998). "Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark." *Apmis* 106(6): 606-22.
- Aarestrup, F. M. and B. Carstensen (1998). "Effect of tylosin used as a growth promoter on the occurrence of macrolide-resistant enterococci and staphylococci in pigs." *Microb Drug Resist* 4(4): 307-12.
- Aarestrup, F. M. and J. Engberg (2001). "Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*." *Vet Res* 32(3-4): 311-21.
- Aarestrup, F. M. and L. B. Jensen (2002). "Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs." *Vet Microbiol* 89(1): 83-94.
- Aarestrup, F. M., E. M. Nielsen, et al. (1997). "Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark." *Antimicrob Agents Chemother* 41(10): 2244-50.
- Aarestrup, F. M., A. M. Seyfarth, et al. (2001). "Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark." *Antimicrob Agents Chemother* 45(7): 2054-9.
- Afssa (2004). Appréciation des risques alimentaires liés aux *Campylobacters*. Application au couple poulet/*Campylobacter jejuni*.
- Afssa-a (2002). Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine. p :1-82.
- Afssa-b (2002). Rapport intermédiaire : utilisation des antibiotiques chez l'animal et résistance aux antibiotiques chez les bactéries d'origine animale. Programme français 1999 - 2000.

- Aga, D. S., R. Goldfish, et al. (2003). "Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes." *Analyst* 128(6): 658-62.
- Aliabadi, F. S., M. F. Landoni, et al. (2003). "Pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and PK-PD integration of danofloxacin in sheep biological fluids." *Antimicrob Agents Chemother* 47(2): 626-35.
- Allen, J. P., G. W. Kaatz, et al. (2003). "Activities of mutant prevention concentration-targeted moxifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacodynamic model." *Antimicrob Agents Chemother* 47(8): 2606-2614.
- Allen, J. W., L. Viel, et al. (1992). "Changes in the bacterial flora of the upper and lower respiratory tracts and bronchoalveolar lavage differential cell counts in feedlot calves treated for respiratory diseases." *Can J Vet Res* 56(3): 177-83.
- Allouch, P., O. Bellon, et al. (2001). *Recommandations méthodologiques pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques dans les laboratoires de microbiologie.*, ONERBA.
- Ambrose, P. G. and D. M. Grasela (2000). "The use of Monte Carlo simulation to examine pharmacodynamic variance of drugs: fluoroquinolone pharmacodynamics against *Streptococcus pneumoniae*." *Diagn Microbiol Infect Dis* 38(3): 151-7.
- Aminov, R. I., J. C. Chee-Sanford, et al. (2002). "Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria." *Appl Environ Microbiol* 68(4): 1786-93.
- Andrews, J. M. (2001). "BSAC standardized disc susceptibility testing method." *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1: 43-57.
- Andrews, J. M. (2001). "The development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing." *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1: 29-42.
- Anonymous (2003). *WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe - 8th report 1999-2000*, OMS.
- Arcangioli, M. A., S. Leroy-Setrin, et al. (1999). "A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104." *FEMS Microbiol Lett* 174(2): 327-32.
- Arcangioli, M. A., S. Leroy-Setrin, et al. (2000). "Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella Typhimurium* strains implicates definitive phage type (DT) 104." *J Med Microbiol* 49(1): 103-10.
- Austin, D. J. (1998). "The dynamics of drug action on the within host population growth infectious agents: melding pharmacokinetics with pathogen population dynamics." *J Theor Biol* 194(3): 313-339.

- Avrain, L., F. Humbert, et al. (2003). "Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use." *Vet Microbiol* 96(3): 267-76.
- Bager, F., F. M. Aarestrup, et al. (1999). "Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin." *Microb Drug Resist* 5(1): 53-6.
- Bager, F., M. Madsen, et al. (1997). "Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms." *Prev Vet Med* 31(1-2): 95-112.
- Baucheron, S., E. Chaslus-Dancla, et al. (2004). "Role of TolC and parC mutation in highlevel fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT204." *J Antimicrob Chemother* 53(4): 657-9.
- Belloc, C., G. Scimia, et al. (2000). "Effet de l'administration de fluméquine par voie orale sur le profil d'antibiorésistance des *Escherichia coli* de la flore fécale du porc." *Journées Rech. porcine en France* 32: 39-44.
- Bertrand, G., I. Bouvarel, et al. (2002). Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in different types of calves, pigs and turkeys production. 48ème International Congress of Meat and Science Technology, Rome.
- Bischoff, K. and J. Jacob (1996). "[The sat4 streptothricin acetyltransferase gene of *Campylobacter coli*: its distribution in the environment and use as epidemiological marker]." *Zentralbl Hyg Umweltmed* 198(3): 241-57.
- Boerlin, P., A. Wissing, et al. (2001). "Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs." *J Clin Microbiol* 39(11): 41935.
- Borgen, K., M. Sorum, et al. (2001). "VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned." *Int J Food Microbiol* 64(1-2): 89-94.
- Borriello, S. P. and R. J. Carman (1983). "Association of iota-like toxin and *Clostridium spiroforme* with both spontaneous and antibiotic-associated diarrhea and colitis in rabbits." *J Clin Microbiol* 17(3): 414-8.
- Bouyer, J., D. Hémon, et al. (1995). *Epidémiologie, Principes et méthodes quantitatives*. Paris, Inserm. 498 p.
- Brana, H., J. Hubacek, et al. (1974). "The effect of actinomycin D and flavomycin on *Escherichia coli* R+ strains." *Folia Microbiol* 18: 257-259.
- Butel, M. J. and Y. Boussougant (1986). "[Effect of erythromycin on the fecal flora of infants less than 1-year old]." *Pathol Biol (Paris)* 34(5 Pt 2): 591-5.
- Campagnolo, E. R., K. R. Johnson, et al. (2002). "Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations." *Sci Total Environ* 299(1-3): 89-95.

- Caprioli, A., L. Busani, et al. (2000). "Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies." *Int J Antimicrob Agents* 14(4): 295-301.
- Cerniglia, C. E. and S. Kotarski (1999). "Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora." *Regul Toxicol Pharmacol* 29(3): 238-61.
- Charlet, F. (1996). Les gastro-entérites à *Campylobacter* en Charente Maritime, Direction départementale de l'action sanitaire et sociale.
- Chaslus-Dancla, E., J. P. Lafont, et al. (2000). "Spread of resistance from food animals to man: the French experience." *Acta Vet Scand Suppl* 93: 53-60; discussion 60-1.
- Chaslus-Dancla, E., J. L. Martel, et al. (1986). "Emergence of aminoglycoside 3-Nacetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from animals in France." *Antimicrob Agents Chemother* 29(2): 239-43.
- Chauvin, C., M. Gicquel-Bruneau, et al. (2005). "Use of avilamycin for growth promotion and avilamycin-resistance among *Enterococcus faecium* from broilers in a matched casecontrol study in France." *Prev Vet Med* 70(3-4):155-163.
- Chee-Sanford, J. C., R. I. Aminov, et al. (2001). "Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities." *Appl Environ Microbiol* 67(4): 1494-502.
- Chiappini, E., L. Galli, et al. (2002). "Results of a 5-year prospective surveillance study of antibiotic resistance among *Salmonella enterica* isolates and ceftriaxone therapy among children hospitalized for acute diarrhea." *Clin Ther* 24(10): 1585-94.
- Chopra, I. O., A.J; Miller, K. (2003). "The role of mutators in the emergence of antibioticresistant bacteria." *Drug Resist Updat* 6(3): 137-145.
- Christie, P. J., J. N. Davidson, et al. (1983). "Effects of tylosin feeding on the antibiotic resistance of selected gram-positive bacteria in pigs." *Am J Vet Res* 44(1): 126-8.
- Collier, C. T., J. D. van der Klis, et al. (2003). "Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis." *Antimicrob Agents Chemother* 47(10): 3311-7.
- Cornaglia, G., A. Lonroth, et al. (2004). "Report from the European Conference on the Role of Research in Combating Antibiotic Resistance, 2003." *Clin Microbiol Infect* 10(5): 473-97.
- Corpet, D. E. (1984). "The effect of bambermycin, carbadox, chlortetracycline and olaquinox on antibiotic resistance in intestinal coliforms: a new animal model." *Ann Microbiol (Paris)* 135A(2): 329-39.

- Corpet, D. E. (1993). "An evaluation of methods to assess the effect of antimicrobial residues on the human gut flora." *Vet Microbiol* 35(3-4): 199-212.
- Craig, W. A. (1998). "Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men." *Clin Infect Dis* 26(1): 1-10; quiz 11-2.
- Crawford, L. (1984). *Bambermycins. Antibiotics, sulphonamides and public health.* T. Jukes, D. HL and C. LM. Boca Raton, Fla, CRC Press. 1: 351-354.
- Dagan, R., K. P. Klugman, et al. (2001). "Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy." *J Antimicrob Chemother* 47(2): 129-40.
- Daikos, G. L., V. T. Lolans, et al. (1991). "First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use." *Antimicrob Agents Chemother* 35(1): 117-23.
- DANMAP (1997). DANMAP 97 - Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. F. BAGER. Copenhagen, Danish Zoonosis Center.
- DANMAP (1998). DANMAP 98 - Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. F. BAGER. Copenhagen, Danish Zoonosis Center.
- DANMAP (2001). DANMAP 2001 - Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Copenhagen, Danish Zoonosis Center.
- DANMAP (2002). DANMAP 2002 - Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. H. EMBORG. Copenhagen, Danish Zoonosis Center.
- DANMAP (2003). DANMAP 2003 - Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Copenhagen, Danish Zoonosis Center.
- Davison, H. C. L., J.C; Woolhouse, M.E. (2000). "What is antibiotic resistance and how can we measure it?" *Trends. Microbiol.* 8(12): 554-559.
- Dawson, K. A., B. E. Langlois, et al. (1983). "Multiple antibiotic resistance in fecal, cecal and colonic coliforms from pigs fed therapeutic and subtherapeutic concentrations of chlortetracycline." *J Anim Sci* 57(5): 1225-34.
- Dawson, K. A., B. E. Langlois, et al. (1984). "Antibiotic resistance in anaerobic and coliform bacteria from the intestinal tract of swine fed therapeutic and

- subtherapeutic concentrations of chlortetracycline." J Anim Sci 58(1): 123-31.
- De Liguoro, M., V. Cibir, et al. (2003). "Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil." Chemosphere 52(1): 203-12.
- Dealy, J. and M. W. Moeller (1976). "Influence of bambarmycins on *Salmonella* infection and antibiotic resistance in swine." J Anim Sci 42(5): 1331-6.
- Dealy, J. and M. W. Moeller (1977). "Effect of bambarmycins on *Escherichia coli* and antibiotic resistance in calves." J Anim Sci 45(6): 1239-42.
- Delepee, R., H. Pouliquen, et al. (2004). "The bryophyte *Fontinalis antipyretica* Hedw. bioaccumulates oxytetracycline, flumequine and oxolinic acid in the freshwater environment." Sci Total Environ 322(1-3): 243-53.
- Delsol, A. A., M. Anjum, et al. (2003). "The effect of chlortetracycline treatment and its subsequent withdrawal on multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and commensal *Escherichia coli* in the pig." J Appl Microbiol 95(6): 12261234.
- Delsol, A. A., J. Sunderland, et al. (2004). "Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin." J Antimicrob Chemother 53(5): 872-4.
- Delsol, A. A., M. J. Woodward, et al. (2004). "Effect of a 5 day enrofloxacin treatment on *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 in the pig." J Antimicrob Chemother 53(2): 396-398.
- DePaola, A., J. T. Peeler, et al. (1995). "Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds." Appl Environ Microbiol 61(6): 2335-40.
- Desmots, M. H., F. Dufour-Gesbert, et al. (2004). "Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans." J Antimicrob Chemother 54(6): 1025-30.
- Desmots, M. H., I. Lebeau, et al. (2003). Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolated from chickens in France between 1992 and 2002. CHRO.
- Directorate., V. M. (2002). Sales of antimicrobial products used as veterinary medicines, growth promoters and coccidiostats in the UK in 2000., Veterinary Medicines Directorate.
- Donabedian, S. M., L. A. Thal, et al. (2003). "Molecular characterization of gentamicinresistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food." J Clin Microbiol 41(3): 1109-13.



- Dore, K., J. Buxton, et al. (2004). "Risk factors for *Salmonella* typhimurium DT104 and nonDT104 infection: a Canadian multi-provincial case-control study." *Epidemiol Infect* 132(3): 485-93.
- Doublet, B., D. Boyd, et al. (2005). "The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element." *Mol Microbiol* 55(6): 1911-24.
- Doublet, B., P. Butaye, et al. (2004). "*Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance gene clusters in *Salmonella* enterica serovar Agona isolated in Belgium in 1992 to 2002." *Antimicrob Agents Chemother* 48(7): 2510-7.