

Rencontres
scientifiques
de
l'Anses



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Antibiorésistance en santé animale et dans l'environnement

Stratégies de recherche
en appui des enjeux majeurs

Dossier du participant

15

novembre 2017

Maison de la RATP
Salle du centenaire
Paris - 12^e

ÉDITORIAL

L'Anses est fortement mobilisée dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques, au travers de la surveillance des niveaux de résistance des bactéries animales, par ses activités de recherche et de référence, et notamment par la coordination de l'EJP « One Health », programme conjoint européen destiné à acquérir de nouvelles connaissances sur les résistances aux antibiotiques. L'Agence s'implique aussi dans l'antibiorésistance par l'animation du réseau national Résapath, par la conduite de travaux d'évaluation des risques liés à l'utilisation des antibiotiques en santé animale ou encore par l'évaluation réglementaire avant autorisation de mise sur le marché des antibiotiques en médecine vétérinaire.

Dans la continuité de cet engagement, l'Agence organise pour la 8^e année consécutive cette journée consacrée à l'antibiorésistance en santé animale et dans l'environnement, et par extension en santé humaine, à destination de l'ensemble des parties prenantes.

Ce colloque s'inscrit pleinement dans la mise en œuvre de la feuille de route interministérielle adoptée le 17 novembre 2016, qui vise à renforcer et coordonner les efforts pour lutter plus efficacement contre l'antibiorésistance dans l'ensemble des secteurs. Les résultats produits par l'Agence sur l'évolution nationale des résistances chez l'animal (rapport Résapath) et des ventes d'antibiotiques vétérinaires seront présentés, ainsi que des éclairages sur différentes stratégies de recherche contribuant à relever les défis en cours.

Préserver l'efficacité des antibiotiques pour le traitement des maladies de l'Homme et de l'animal est un défi majeur en santé publique pour les années à venir, tant les espoirs sont faibles de voir apparaître de nouvelles familles d'antibiotiques dans un futur proche.

Gageons que cette 8^e journée de l'Anses consacrée à la lutte contre l'antibiorésistance sera l'occasion d'échanges fructueux entre les différents acteurs de la santé humaine et animale, afin de préserver l'efficacité de ce bien commun que sont les antibiotiques.

Roger GENET
Directeur général de l'Anses

OUVERTURE

Roger GENET

Directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)

Roger Genet a été nommé Directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, le 24 mai 2016.

Directeur général de la recherche et de l'innovation au ministère chargé de la Recherche depuis mars 2012, ancien président de l'Alliance nationale de recherche pour l'environnement ALLEnvi, Roger Genet est un scientifique investi depuis plus de dix ans dans les politiques de recherche et d'expertise, en appui aux politiques publiques, dans les domaines de la santé, de l'agriculture et de l'environnement.

Marc MORTUREUX

Directeur général de la prévention des risques

Ingénieur général des Mines, Marc Mortureux est directeur général de la prévention des risques, au ministère de la Transition écologique et solidaire. Auparavant, il a été le directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). Au cours de sa carrière, Marc Mortureux a exercé des responsabilités aussi bien dans le secteur public que dans le privé : au sein de Peugeot où il a été chargé de mission auprès d'un directeur d'usine, de Technip Géoproduction, ou encore de la Compagnie générale de géophysique où il a été directeur de la Recherche et du Développement, puis directeur général de Petrosystems. Il a travaillé à la direction d'Airparif, l'association chargée de la surveillance de la pollution atmosphérique en Île-de-France et dirigé le Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE). C'est à ce titre qu'il a été élu, en 2005, président d'Eurolab. Il a aussi fait partie de l'équipe dirigeante de l'Institut Pasteur de 2006 à 2008, avant de diriger le cabinet du secrétaire d'État chargé de la Consommation et du Tourisme, puis du secrétaire d'État chargé de l'Industrie et de la Consommation entre 2008 et 2010.

Patrick DEHAUMONT

Directeur général de l'alimentation

Patrick DEHAUMONT est Directeur général de l'alimentation au Ministère de l'agriculture et de l'alimentation en charge de la politique de santé animale, de bien-être animal, de santé végétale et de la sécurité sanitaire des aliments.

CLÔTURE

Benoît VALLET

Directeur général de la santé

Pr. Benoit VALLET a été nommé Directeur général de la Santé, le 23 Octobre 2013, au Ministère en charge de la santé. Il représente la France au Conseil Exécutif de l'OMS depuis 2015 et a présidé le Conseil régional de la région OMS Europe jusqu'à septembre 2017.

Il a animé le comité interministériel chargé de préparer la feuille de route gouvernementale sur l'antibiorésistance, et promu une coordination par la France de l'action conjointe européenne sur l'antibiorésistance et les infections associées aux soins.

DISCUSSION AVEC LA SALLE – CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Jean-Yves MADEC

Directeur scientifique Antibiorésistance – Laboratoire de Lyon – Anses

Jean-Yves MADEC est directeur de recherches, chef de l'unité antibiorésistance et virulence bactériennes à l'Anses - site de Lyon et Directeur scientifique antibiorésistance de l'Anses. Membre du Conseil scientifique de l'Onerba, Président du groupe vétérinaire du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie et membre de plusieurs groupes d'expertise, il est fortement impliqué dans la surveillance de la résistance aux antibiotiques chez l'animal et conduit des activités de recherche sur les mécanismes moléculaires de la résistance et de la virulence bactériennes.

Ventes d'antibiotiques en médecine vétérinaire, rapport 2017

Gérard MOULIN – Agence nationale du médicament vétérinaire (AMNV) – Anses

BIOGRAPHIE

Directeur de recherches, adjoint au directeur de l'Anses/ANMV, en charge en particulier des questions relatives à l'antibiorésistance. Responsable du suivi national des ventes d'antibiotiques en médecine vétérinaire. Participation aux groupes de travail nationaux, européens et internationaux traitant d'antibiorésistance. Président du Comité des médicaments vétérinaires de 2002 à 2010. Président de l'AMEG (Antimicrobial Expert Group), Membre du groupe de coordination inter-agences des Nations Unies (IACG).

RÉSUMÉ

L'Agence a mis en place, depuis 1999, un suivi annuel des ventes d'antibiotiques vétérinaires basé sur une déclaration annuelle des ventes d'antibiotiques par les laboratoires qui les commercialisent et couvre 100 % des médicaments autorisés. Les laboratoires fournissent également une estimation de la répartition par espèces de destination.

Comment doit-on interpréter ces résultats ?

Les tonnages d'antibiotiques vendus ne traduisent pas précisément leur utilisation. En effet, les antibiotiques récents sont plus actifs et nécessitent l'administration d'une quantité d'antibiotique plus faible. Pour évaluer l'exposition des animaux aux antibiotiques, il est nécessaire de prendre en compte, en particulier, la posologie et la durée d'administration, mais aussi l'évolution de la population animale au cours du temps. L'ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials) estime le niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques. Le plan national EcoAntibio mis en place en médecine vétérinaire en 2012 vise une réduction de 25 % de l'usage des antibiotiques (toutes familles confondues) en 5 ans en maintenant durablement l'arsenal thérapeutique.

Volumes de ventes :

En 2016, le volume total moyen des ventes est proche de 530 tonnes d'antibiotiques et en diminution de 18,5 % par rapport à la moyenne des années 2014 et 2015.

Alors que le tonnage d'antibiotiques vendus en France était de 1311 tonnes en 1999, il se situait à 910 tonnes en 2011 année de référence pour le plan Ecoantibio. Les 530 tonnes enregistrées en 2016 correspondent à une réduction de 41,8 % par rapport à 2011.

Exposition des animaux aux antibiotiques

Depuis le début du suivi en 1999, l'indicateur d'exposition des animaux aux antibiotiques (ALEA) a diminué de 31,4 % en France. En 2016, l'ALEA s'inscrit en baisse de 20,5 % par rapport à la moyenne des années 2014 et 2015.

Toutes espèces animales confondues, l'exposition globale a diminué de 36,6 % en France sur les cinq dernières années.

La baisse de l'exposition aux antibiotiques a été observée pour toutes les espèces par rapport à l'année 2011 (bovins : -24,3 %, porcs : -41,5 %, volailles : -42,8 %, lapins : -37,6 %, chats et chiens : -19,4 %).

L'objectif de réduction de 25 % de l'usage des antibiotiques (toutes familles confondues) en 5 ans prévu par le plan Ecoantibio 2017 est atteint et largement dépassé.

Les Céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations et les Fluoroquinolones

Les Céphalosporines de 3ème et 4ème générations et les Fluoroquinolones sont considérées comme des antibiotiques particulièrement importants en médecine humaine car elles constituent l'alternative ou une des seules alternatives pour le traitement de certaines maladies infectieuses chez l'homme. Selon les recommandations européennes, ces antibiotiques doivent ainsi être réservés au traitement curatif en deuxième intention.

La loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt fixe un objectif de réduction de 25 % en 3 ans de l'utilisation de ces familles d'antibiotiques en prenant l'année 2013 comme année de référence..

L'exposition aux Céphalosporines de dernières générations a diminué de 81,3 % en 2016 par rapport à 2013, toutes espèces confondues. L'ALEA pour cette famille d'antibiotiques a diminué pour les bovins (-81,6 %), les porcs (-85,1 %), et les carnivores domestiques (-71,6 %). **Une diminution de l'exposition aux Fluoroquinolones de 74,9 % a été observée en 2016 par rapport à 2013.** L'ALEA pour cette famille d'antibiotiques a diminué pour les bovins (-82,6 %), les porcs (-72,7 %), les volailles (-45,3%) et les carnivores domestiques (-57,4 %).

L'objectif prévu par la loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt est atteint et largement dépassé.

La colistine

La publication en novembre 2015 décrivant le premier mécanisme de résistance à la colistine transférable par plasmide a conduit à la mise en place d'une surveillance renforcée pour cet antibiotique.

Le plan Ecoantibio2 (Action 12) a fixé l'objectif d'une réduction de 50 % en 5 ans de l'exposition à la colistine en filières bovine, porcine et avicole, en prenant comme référence l'ALEA moyen 2014-2015.

Avec un ALEA de 0,064 pour l'année 2016, l'exposition à la colistine a diminué de 40,3 % par rapport à l'exposition moyenne calculée pour les années 2014 et 2015. L'exposition en 2016 a diminué pour les bovins (-43,4 %), les porcs (-51,6 %), et les volailles (-26,7 %) par rapport à l'exposition moyenne sur les années 2014-2015.

Ces bons résultats témoignent d'un engagement efficace de l'ensemble des parties prenantes dans la lutte contre l'antibiorésistance. La mobilisation et les efforts entrepris pour l'utilisation prudente et responsable des antibiotiques en médecine vétérinaire doivent se poursuivre pour inscrire dans la durée les progrès réalisés.

Surveillance programmée de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries d'origine animale : résultats majeurs en 2017

Agnès PERRIN-GUYOMARD – Laboratoire de Fougères – Anses

BIOGRAPHIE

Agnès PERRIN a intégré le laboratoire de l'Anses Fougères en 1998 pour étudier l'impact des antibiotiques sur la diversité et les fonctions du microbiote intestinal. Elle a par ailleurs pris en charge les activités de surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries indicatrices *Escherichia coli* et *Enterococcus* isolées chez l'animal sain à l'abattoir ou dans les aliments. Depuis 2015, elle est responsable du LNR résistance antimicrobienne.

RÉSUMÉ

La surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries commensales et zoonotiques est réglementée au sein de l'Union Européenne par la directive 2003/99/CE. La décision 2013/652 complète ce dispositif et harmonise les systèmes de surveillance entre chaque Etat Membre. La surveillance est organisée alternativement tous les deux ans : chez les volailles (poulets de chair, poules pondeuses et dindes) les années paires et chez les animaux de boucherie (bovins et porcins) les années impaires. Les espèces bactériennes à surveiller sont *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., et *E. coli*. La résistance aux antimicrobiens est évaluée par la mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur un nombre de souches défini et les valeurs obtenues sont comparées aux seuils épidémiologiques de l'EUCAST. De plus, depuis janvier 2015, la détection des *E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (C3G), par production de BLSE, céphalosporinase ou carbapénémase est rendue obligatoire dans les prélèvements de caeca à l'abattoir et dans les viandes à la distribution. Les résultats des Etats Membres sont publiés par l'EFSA en janvier de l'année N+2.

Concernant la France, les faits marquants de la campagne 2016 chez les volailles sont : i) une augmentation de 2009 à 2016 des pourcentages de résistance des souches de *C. jejuni* de poulets, vis-à-vis des quinolones et fluoroquinolones, alors que les résistances à la streptomycine, la gentamicine et l'érythromycine restent globalement stables ; ii) une diminution significative des pourcentages de résistance à la tétracycline et aux céphalosporines chez les *E. coli* isolés du poulet à l'abattoir ; iii) une augmentation du nombre de souches *E. coli* sensibles à tous les antibiotiques testés entre 2007 (4,5%) et 2016 (18,7%) chez la dinde ; iv) un pourcentage de viandes de poulet à la distribution contenant des souches de *E. coli* résistantes aux céphalosporines supérieur à 50 % ; v) des niveaux de résistance à la colistine très bas chez les souches de *E. coli* isolées chez le poulet et chez la dinde à l'abattoir.

Sur les cinq dernières années, la diminution de l'exposition des animaux aux antibiotiques (rapport Anses 2016) a sans doute contribué à diminuer certains pourcentages de résistance chez les bactéries isolées d'animaux sains à l'abattoir. Le plan Ecoantibio2 (2017-2021) doit permettre de consolider cette réduction de la résistance vis-à-vis de l'ensemble des antibiotiques et de réduire de manière spécifique, la prévalence des *E. coli* résistants aux céphalosporines dans la viande de poulet à la distribution.



Surveillance de la résistance animale par le réseau Résapath : faits marquants en 2017

Marisa HAENNI – Laboratoire de Lyon – Anses

BIOGRAPHIE

Marisa HAENNI est scientifique et chef d'unité adjointe de l'unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes (AVB), au laboratoire de l'Anses de Lyon. Elle est impliquée dans la surveillance et l'épidémiologie moléculaire des mécanismes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries d'origine vétérinaire, et participe à la coordination du réseau Résapath. Ses axes de recherche majeurs concernent les enjeux croisés Homme-animal, surtout chez les entérobactéries et les staphylocoques.

RÉSUMÉ

Le réseau Résapath collecte les données d'antibiogrammes des bactéries issues de prélèvements cliniques d'origine animale en France, et assure ainsi une couverture nationale des taux de résistances aux antibiotiques dans les différents secteurs. Son périmètre a encore progressé en 2016, comme c'est le cas de manière ininterrompue depuis 2005. En 2016, il compte le même nombre de laboratoires adhérents qu'en 2015 (74) mais a collecté 53 691 antibiogrammes (versus 41 298 en 2015). La répartition des antibiogrammes par espèce animale est la suivante : volailles (25,1 %), bovins (23,6 %), chiens (22,6 %). Les chats sont en 4^{ème} position (7 %), suivis des chevaux (6,8 %) et des porcs (6,5 %).

Comme chaque année, une attention particulière est portée sur la résistance aux antibiotiques critiques. La proportion la plus élevée de résistance aux C3G/C4G se situe autour de 5 à 7 %. Cette proportion est retrouvée chez les veaux, les chiens et les chats, et les équidés. Dans les autres espèces, elle est égale ou inférieure à 3 % (poules et poulets, porcs, bovins adultes et dindes). La tendance à la baisse de la résistance aux C3G/C4G est plus marquée chez les veaux et carnivores domestiques, et moindre chez les équidés. Chez les poules/poulets, porcs et dindes, les proportions de résistance aux C3G/C4G (≤ 3 %) sont stables depuis deux ans. En ce qui concerne les fluoroquinolones, les proportions de souches résistantes restent toujours globalement supérieures à celles aux C3G/C4G, quelles que soient les espèces animales. La filière bovine est celle présentant la proportion de résistance aux fluoroquinolones la plus élevée (16,5 %), mais avec une forte décroissance en 2016, et de façon générale depuis 2010. C'est également le cas pour les chiens et les chats (22 % en 2010, 13 % en 2016). Les équidés, poules/poulets et dindes sont les espèces animales chez lesquelles la proportion de résistance aux fluoroquinolones est la plus basse (5 à 7 %). La tendance à la stabilisation observée en 2015 l'est encore en 2016, ainsi que chez les porcs (10 %).

S'agissant de la résistance à la colistine, et malgré les limites de la méthode (diffusion) pour son évaluation *in vitro*, l'exploitation des données montre une situation maîtrisée sur 10 ans, avec une augmentation significative de la proportion des souches sensibles. Des données moléculaires ont montré la présence sur le territoire français des gènes *mcr-1* et *mcr-3*. Des études sont actuellement en cours pour rechercher la présence des gènes *mcr-4* et *mcr-5*.

En ce qui concerne les antibiotiques non critiques, chez *E. coli*, la tendance globale à la baisse ou la stabilisation (période 2006-2016) identifiée les années précédentes demeure. Sur 10 ans, la diminution de la résistance à la tétracycline dans les filières volailles, et dans une moindre mesure dans la filière porc, est le phénomène le plus marquant. En filière bovine, où les niveaux de résistance à l'amoxicilline, à la tétracycline et aux aminosides (hors gentamicine) sont très élevés, il n'y a que très peu d'évolutions depuis dix ans. La multi-résistance, définie comme la résistance à au moins trois antibiotiques parmi cinq testés issus de familles différentes, est toujours plus marquée en filières bovine parmi les souches résistantes aux C3G/C4G. Cependant, sur la période 2011-2016, la proportion de souches multi-résistantes est en diminution significative dans toutes les espèces.

Un fait marquant en 2016 est l'émergence sporadique des premières souches résistantes aux carbapénèmes identifiées pour la première fois au travers du Resapath, malgré l'absence d'usage de ces antibiotiques. Ces souches ont été identifiées chez l'animal de compagnie, chez *Pseudomonas aeruginosa* mais également chez *Klebsiella pneumoniae* et chez *E. coli*.

Finalement, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) est isolé de prélèvements infectieux animaux en France à des fréquences variables. En effet, il est quasi inexistant chez les bovins et les porcs en contexte infectieux. La proportion la plus élevée, de l'ordre de 5 %, est trouvée chez les équidés, principalement due au clone CC398. Chez le chien, la proportion de SARM est très faible (1-2 %), et la plupart sont des clones humains. En revanche, le gène *mecA* est toujours retrouvé de façon importante chez *Staphylococcus pseudintermedius*, pathogène majeur du chien (15-20 % des souches).

Effet des antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur la dynamique d'éléments génétiques mobiles vecteurs d'antibiorésistance

Christophe MERLIN – Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564 Université de Lorraine-CNRS

BIOGRAPHIE

Maître de Conférences à l'Université de Lorraine depuis 2005, Christophe MERLIN exerce ses activités de recherche au sein de l'équipe de « Microbiologie environnementale » au LCPME. Biologiste moléculaire, spécialisé en génétique bactérienne, il s'intéresse aux transferts de gènes de résistance dans l'environnement, et en particulier à la caractérisation d'environnements et conditions permissifs, voire stimulateurs, d'éléments génétiques mobiles vecteurs de l'antibiorésistance.

RÉSUMÉ

Notre incapacité croissante à traiter les maladies infectieuses autrefois guérissables est étroitement liée à la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être mobilisés par une pléthore d'éléments génétiques mobiles (EGM). Au-delà de leurs propriétés sélectives, les antibiotiques s'avèrent également jouer un rôle déterminant à des concentrations sub-inhibitrices, où certains d'entre eux peuvent induire l'expression des fonctions de mobilité d'EGM et donc favoriser leur dissémination. Démontrer un tel effet stimulateur est une entreprise compliquée car il n'existe pas de moyen évident pour identifier un antibiotique actif (en tant que stimulateur) ou encore sa concentration effective. Inspirés par J. Davies et ses collaborateurs, nous avons récemment développé une approche de criblage afin d'identifier les antibiotiques capables de moduler l'activité des gènes de mobilité d'EGM sans pour autant avoir à en connaître leurs concentrations inductrices. L'approche repose sur l'utilisation de « rapporteurs bactériens » possédant une fusion transcriptionnelle entre un promoteur de gène de mobilité d'EGM et des gènes *lux*, de manière à ce qu'une bioluminescence soit émise lorsque le promoteur du gène de mobilité devient actif. Ces rapporteurs bactériens sont exposés à des gradients de concentration en antibiotiques, obtenus par diffusion en gélose, à la manière d'un antibiogramme. L'émission de lumière est enregistrée à l'aide d'une caméra CCD à haute sensibilité afin de révéler l'activité des promoteurs, et des profils d'induction sont finalement extraits à l'aide d'un logiciel de traitement d'image automatisé maison. Avec une telle procédure de criblage, nous avons été en mesure de déterminer les effets de plus de 50 antibiotiques sur 80 promoteurs de divers EGM et parfois d'identifier des spectres d'induction plus larges qu'anticipé. Pour *Tng16* par exemple, nous avons pu identifier plusieurs antibiotiques capables d'activer l'expression des fonctions de transfert, y compris des antibiotiques pour lesquels l'élément ne code aucune résistance (Macrolides-Lincosamides-Streptogramines). L'activation du transfert de *Tng16* par ces mêmes antibiotiques en concentrations sub-CMI a par ailleurs été confirmée *in vitro*. Nos observations montrent clairement une déconnexion entre le caractère inducteur de certaines molécules antibiotiques et l'avantage sélectif apporté par les gènes de résistance disséminés, ce qui pose la question des risques associés à certaines antibiothérapies aux larges « propriétés inductrices ». Les possibilités offertes par cette approche pour identifier les molécules et environnements inducteurs d'EGM dans la réalité complexe de situations environnementales seront discutées.

Analyse de la dynamique de l'évolution des résistances dans les rejets urbains et hospitaliers

Christophe DAGOT – RESINFIT UMR INSERM 1092 – Limoges

BIOGRAPHIE

Pr Christophe DAGOT a rejoint l'UMR INSERM 1092 de l'Université de Limoges (Dir.M. Ploy) après 20 ans dans un laboratoire eau et Environnement (GRESE-UNILIM). Combinant ces deux points de vue, il développe actuellement des travaux sur le stress antibiotique et les biomarqueurs de résistance dans l'environnement. Il a collaboré aux projets PiLLS, NoPiLLS et SIPIBEL sur l'impact des effluents hospitaliers sur la dissémination des bactéries multi résistantes et coordonne un nouveau projet ANSES 2018, PANDORE.

RÉSUMÉ

La dissémination de la résistance des bactéries aux antibiotiques dans l'environnement reste une problématique majeure interpellant les gestionnaires du risque sanitaire, du corps médical, les scientifiques, ainsi que les exploitants et gestionnaire de centres d'activités de soins, de stations d'épuration et de l'environnement (conférence ANSES, 2015). Ainsi, des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) sont retrouvés chez des bactéries isolées en clinique mais aussi chez des espèces environnementales montrant que le résistome environnemental et les résistances chez les pathogènes ne sont pas indépendants. Les centres de soins, les stations de traitement des effluents, les fermes d'élevage, les piscicultures ou les centres de stockage sont alors considérés comme des plateformes de transit et d'échange de bactéries multi-résistantes, de ARG et d'éléments génétiques mobiles (EGM).

Afin de caractériser cette dynamique, des indicateurs globaux de dissémination de résistances peuvent être utilisés, comme les intégrons, les intégrons peuvent être utilisés. Les intégrons sont des éléments génétiques ubiquitaires dans l'environnement et impliqués dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux antibiotiques, véhiculant sous forme de cassettes des gènes de résistance à quasiment toutes les familles d'antibiotiques. Cependant cet « indicateur » reste global et ne permet pas, tel qu'il est utilisé, une analyse fine, spécifiquement qualitative et quantitative, de la dissémination des gènes.

Les nouveaux outils de métagénomique apportent de nouvelles informations sur la présence récurrente des ARGS et sur la nature des groupes bactériens dans tous les environnements.

A partir de 10 sites hospitaliers en Europe, nous avons identifié dans les eaux usées urbaines et hospitalières échantillonnées mensuellement sur une période de quatre ans :

- Le contenu en cassettes d'intégrons par séquençage haut débit (NGS) ciblant les intégrons de classe 1 et analyse des données avec le logiciel IntegronFinder. Dans tous les effluents, une forte proportion de cassettes de résistance aux aminosides ou aux bêta-lactamines ont été identifiées. Chacun des 10 effluents a affiché une signature spécifique.
- Le résistome global, (ARG, EGM, intégrons) par une technique de PCR à haut débit microfluidique.
- Le microbiome (populations bactériennes et structures communautaires) par NGS ciblant l'ARNr 16S
- Les résidus d'antibiotiques, de surfactants et de métaux lourds pour tous les échantillons d'eau

Cette analyse a permis d'identifier une signature distincte du résistome et du microbiome pour chacun des hôpitaux et des eaux usées urbaines analysées et corrélés significativement les molécules analysées avec les données de génomique. D'une manière générale, les ARG, les EGM et les intégrons étaient entre 2 et 156 fois plus élevés dans les eaux usées hospitalières que dans les eaux usées urbaines, sans variation temporelle significative.

Les corrélations identifiées entre les taxons bactériens qui servent d'hôtes putatifs pour ces ARG et ces EGM doivent encore être confirmées afin de définir des moyens de lutte pour limiter la propagation des ARGs dans l'environnement.

Un modèle *in vitro* dynamique pour explorer l'efficacité des traitements antibiotiques

Diane BROUSSOU – TOXALIM UMR 1331, INRA – Ecole nationale vétérinaire de Toulouse

BIOGRAPHIE

Vétérinaire de formation, Diane BROUSSOU a complété son cursus par un M2 en Pharmacologie et Métiers du Médicament. Elle a ensuite débuté une thèse d'université en pharmacologie dans l'équipe « Pharmacocinétique, Pharmacodynamie et Modélisation » du Professeur Bousquet-Mélou, sur le site de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Cette équipe étudie l'antibiorésistance associée à l'usage vétérinaire des antibiotiques, en lien avec les enjeux de santé animale et de santé humaine.

RÉSUMÉ

Le développement des résistances aux antimicrobiens nécessite, entre autres mesures, l'optimisation des stratégies thérapeutiques de lutte contre les infections bactériennes. Au sein des priorités de recherche définies à l'échelle nationale [1] et internationale [2] figure la nécessité d'optimiser la pharmacocinétique et la pharmacodynamie (PK/PD) d'antibiotiques déjà connus afin d'assurer leur utilisation optimale en termes de santé publique, de développer des protocoles de traitement avec des combinaisons d'antibiotiques existants et nouveaux, des thérapeutiques alternatives, et une stratégie de recyclage (« repositioning ») de substances appartenant à d'autres classes thérapeutiques.

Parmi les méthodologies et modèles utilisés pour l'étude des substances antibactériennes, les modèles *in vitro* « dynamiques », qui reproduisent les profils temporels des concentrations de substances auxquelles les bactéries sont exposées *in vivo*, rencontrent un succès grandissant. Le système « Hollow fiber » est un de ces modèles, de plus en plus utilisé pour explorer les relations PK/PD des antibiotiques, mais également de combinaisons originales entre substances antibiotiques et/ou non-antibiotiques.

Le système « Hollow Fiber » est un système clos constitué de deux compartiments distincts, dont un compartiment central dans lequel un milieu nutritif circule au moyen d'une pompe, et un compartiment périphérique contenant des bactéries. Le compartiment périphérique, dans lequel les bactéries sont confinées, est disposé dans une cartouche et séparé du compartiment central par des milliers de fibres creuses (ou capillaires) dont la paroi est une membrane semi-perméable qui bloque les bactéries et laisse diffuser le milieu nutritif et les molécules de petite taille qu'il contient.

Les caractéristiques de ce système et sa souplesse offrent l'opportunité de tester tout un ensemble de conditions, qui visent à se rapprocher des situations rencontrées *in vivo* afin d'accroître son potentiel prédictif.

Sur le volet microbiologique et pharmacodynamique, il peut être utilisé pour étudier les interactions entre des substances actives et des espèces bactériennes différentes, l'impact de la taille des inocula, de la présence d'un biofilm, par exemple pour comparer les activités sur les bactéries planctoniques et les bactéries du biofilm.

Sur le volet pharmacocinétique, il permet de mimer des profils de concentrations de substances actives connues que l'on rencontre chez l'Homme ou chez l'espèce animale d'intérêt, ou à l'inverse de déterminer quels sont les profils garantissant une activité optimale et par conséquent de définir les doses correspondantes. Il est particulièrement utile pour comparer les stratégies d'administration simultanée et séquentielles de molécules actives, afin d'optimiser les synergies ou d'en identifier de nouvelles.

D'abord développé pour mimer les traitements par voie générale d'infections systémiques, la configuration du système permettrait également de simuler l'exposition des bactéries à des substances administrées par voie locale – en les injectant directement dans le compartiment périphérique-, et de tester par exemple la pertinence d'associer voie locale et voie générale. Elle pourrait également être utilisée pour reproduire les processus d'élimination naturelle des bactéries en suspension dans l'urine - en mimant la vidange de la vessie suite à une miction -, ou bien en suspension dans le lait – en mimant la vidange de la mamelle suite à la traite d'une vache atteinte de mammite.

Le développement de ce type de modèle devrait constituer une source de progrès considérables dans le domaine des thérapies des infections bactériennes chez les animaux.

Références

1. Carlet J. et Le Coz P. 2015. Tous ensemble, sauvons les antibiotiques, propositions du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques. http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_antibiotiques.pdf
2. Communication de la commission. Lignes directrices pour une utilisation prudente des antimicrobiens en médecine vétérinaire (2015/C 299/04). https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/2015_prudent_use_guidelines_fr.pdf

Les Eligobiotiques : une arme efficace contre l'antibiorésistance

Matthieu GALTIER – Eligo BioScience

BIOGRAPHIE

Matthieu Galtier est diplômé d'un PhD en microbiologie procaryote et eucaryote (2014) réalisé au sein de l'Institut Pasteur Paris dans le laboratoire du Dr Laurent Debarbieux. Son doctorat portait sur l'étude des interactions entre bactéries pathogènes et bactériophages au sein d'un des environnements des plus complexes qui soit : le microbiote intestinal. Depuis 2014, Matthieu Galtier est chef de projet dans la société Eligo Bioscience. Il est responsable de la mise en place des preuves de concept de la technologie d'Eligo Bioscience *in vivo* dans différents modèles afin de pouvoir basculer vers les essais cliniques.

RÉSUMÉ

Il y a quelques années, les antibiotiques révolutionnaient la médecine moderne. En effet, ces molécules ont notamment permis de diminuer les complications liées à la chirurgie invasive, mais également le développement de procédures amenant une immunodépression chez le patient (chimiothérapie, transplantation d'organes etc.), et ont ainsi permis un accroissement de notre espérance de vie de façon considérable. Cependant, la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui considérée comme l'une des menaces les plus sérieuses pour la santé humaine. L'Organisation Mondiale de la Santé ainsi que la Commission Européenne ont par conséquent d'ores et déjà reconnu l'importance de comprendre l'émergence et les déterminants de la résistance antimicrobienne ainsi que la nécessité de concevoir des stratégies appropriées afin de limiter son développement. Afin de participer à cette lutte active, nous avons récemment développé au laboratoire le premier agent antimicrobien séquence spécifique, appelé «Eligobiotics» provenant du Latin eligere («choisir»). Notre technologie repose sur l'ingénierie d'un vecteur biologique dérivé des bactériophages, appelé phagemide, que nous utilisons pour délivrer un circuit génétique thérapeutique codant pour une nucléase CRISPR-Cas au sein d'une souche pathogène. L'expression de cette nucléase dans la bactérie hôte déclenche ainsi le clivage du génome bactérien en cas de présence d'un gène de résistance aux antibiotiques ou d'un facteur de virulence. Enfin, puisque la plupart des espèces bactériennes ne possèdent pas la capacité de réparer une coupure simultanée double brin sur toutes les copies de leur chromosome, l'introduction d'un tel système abouti à une élimination extrêmement efficace du pathogène ciblé.

Un des réservoirs principaux de bactéries résistantes aux antibiotiques se situe au niveau du tractus gastro-intestinal. En particulier, les souches de *Escherichia coli* productrices de beta-lactamases à spectre étendu (BLSE) retrouvées au niveau de l'intestin, font partis des pathogènes représentant l'une des plus grandes menaces pour la santé publique avec une résistance accrue contre la plupart des antibiotiques disponibles sur le marché. Nous démontrons ici la preuve de concept du potentiel de nos agents antimicrobiens spécifiques de séquences (CRISPR-Cas) à éliminer une souche résistante aux antibiotiques au sein du tractus gastro-intestinal murin.



Le microbiote intestinal : challenges et opportunités pour lutter contre la résistance aux antibiotiques

Etienne RUPPÉ – Université Paris Diderot

BIOGRAPHIE

Etienne Ruppé (PharmD, PhD) est bactériologiste au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Bichat-Claude Bernard à Paris. Son travail de recherche effectué dans l'UMR1137 « IAME » se concentre sur la résistance aux antibiotiques, le microbiote intestinal et l'application du séquençage à haut débit pour le diagnostic des infections.

RÉSUMÉ

Le microbiote intestinal est composé d'environ 10^{23} à 10^{24} micro-organismes (bactéries, Archaea, virus et levures) par gramme de selles, soit environ autant que le nombre de cellules de l'homme qui l'abrite. Il héberge plusieurs centaines d'espèces bactériennes, la plupart non-pathogènes et difficilement cultivables. Le microbiote intestinal exerce un effet dit « de barrière » (ou « résistance à la colonisation ») en cela qu'il s'oppose à la colonisation par des bactéries exogènes comme la plupart des bactéries multirésistantes. Si les mécanismes métaboliques et immunologiques précis qui la sous-tendent sont encore mal connus, on sait que cette fonction essentielle est due aux multiples espèces bactériennes anaérobies qui composent le microbiote intestinal [1]. Ainsi la perte de l'effet barrière est particulièrement visible lors de la prise d'antibiotiques actifs contre les bactéries anaérobies tels que la clindamycine ou le métronidazole. La diminution de la résistance à la colonisation au cours des traitements antibiotiques a pour conséquence l'acquisition et la multiplication de bactéries résistantes ou de pathogènes opportunistes. Ainsi le meilleur moyen de lutter contre l'effet des antibiotiques sur le microbiote intestinal est encore d'éviter d'en prendre. Les leviers possibles sont les changements comportementaux, comme l'a démontré le plan national de l'Assurance Maladie («les antibiotiques, c'est pas automatique») qui a permis de diminuer de plus d'un quart la consommation d'antibiotiques, ou encore le développement de tests rapides permettant d'infirmier l'infection bactérienne, sur le modèle du test rapide de détection de l'angine bactérienne.

Une autre possibilité est de prévenir l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal en inactivant l'antibiotique au niveau du côlon. Les antibiotiques administrés par voie orale sont principalement absorbés au niveau du jéjunum, mais une fraction parvient au niveau du côlon dans lequel la densité bactérienne est maximale. Les antibiotiques administrés par voie parentérale peuvent être filtrés par le foie, puis excrétés par la bile et parvenir également dans le côlon. Ainsi la société américaine Synthetic Biologics développe des bêta-lactamases recombinantes à large spectre dont le but est de détruire les résidus de bêta-lactamines présents dans le côlon. De même, la société française Da Volterra développe un produit à base de charbon activé à libération colique qui devrait permettre d'adsorber un grand nombre d'antibiotiques.

La transplantation fécale consiste à restaurer les fonctions de barrière au microbiote afin qu'il s'oppose à la multiplication des pathogènes. Cette restauration pourrait très bien s'appliquer aux bactéries multirésistantes, ainsi que des observations le suggèrent [2]. Enfin, plutôt que de transférer l'ensemble d'un microbiote intestinal, il pourrait être possible de ne transférer qu'une ou plusieurs souches qui pourraient à elles seules conférer les propriétés antagonistes contre *C. difficile*, *Listeria monocytogenes* ou contre des bactéries multirésistantes. Cette piste prometteuse est actuellement poursuivie par la société américaine Seres Therapeutics qui constitue des microbiotes synthétiques en vue de guérir l'infection à *C. difficile* avec le SER-109 (une capsule contenant un mélange de souches bactériennes), ou d'antagoniser les bactéries multirésistantes avec le SER-155 (contenant un autre mélange de bactérie).

En conclusion, le microbiote intestinal est peut-être un de nos meilleurs alliés dans la lutte contre les bactéries multirésistantes et sa préservation plus que jamais une nécessité.

Références

1. Buffie, C.G. & Pamer, E.G. Nat. Rev. Immunol. 13, 790–801 (2013).
2. Manges, A.R., Steiner, T.S. & Wright, A.J. Infect. Dis. Lond. Engl. 48, 587–592 (2016)

Impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal

Exemple de la colite à *Clostridium difficile*

Charles BURDET – Inserm UMR 1137 – Université Paris Diderot

BIOGRAPHIE

Charles Burdet est médecin, spécialisé en santé publique et en maladies infectieuses. Il est assistant hospitalo-universitaire en biostatistique à l'Université Paris Diderot. Ses travaux de recherche portent sur l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal, qu'il conduit au sein de l'unité Inserm IAME (UMR1137).

RÉSUMÉ

La perturbation des processus métaboliques au sein du microbiote intestinal secondaire suite à l'administration d'antibiotiques favorise la colonisation par *Clostridium difficile*. Dans un modèle animal, cette infection peut conduire à la mort des animaux. Nous avons utilisé un adsorbant à base de charbon actif afin d'étudier les liens entre concentration fécale d'antibiotique, dysbiose et mortalité. Pour cela, nous avons conduit 2 expériences séparées chez des hamsters recevant soit de la moxifloxacine (n=70), soit de la clindamycine (n=60) par voie sous cutanée pendant 5 jours. Plusieurs groupes ont été constitués selon la dose de charbon administrée (entre 0 et 900 mg/kg) par voie orale. Les animaux ont été infectés par voie orale au 3^e jour de traitement par des spores de *Clostridium difficile*. Leur statut vital a été monitoré de J1 à J16, et des échantillons fécaux ont été recueillis juste avant le début du traitement antibiotique et au 3^e jour de traitement. Les concentrations fécales d'antibiotiques ont été mesurées par méthode microbiologique, et l'analyse du microbiote intestinal a été effectuée par séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S. Plusieurs indices de diversité alpha et beta ont été calculés.

Une relation inverse a été mise en évidence entre la dose de charbon administrée et la concentration fécale d'antibiotique mesurée. L'impact du traitement antibiotique sur la diversité du microbiote intestinal était d'autant plus élevé que la concentration fécale d'antibiotique était élevée. Enfin, tous les animaux des groupes traités par antibiotique seul sont morts, et tous les animaux des groupes traités par la plus haute dose de charbon ont survécu. La probabilité de décès était d'autant plus grande que la diminution de la diversité bactérienne était importante. Ces résultats ont été observés avec tous les indices de diversité étudiés. Parmi les indices de diversité alpha, l'indice de diversité de Shannon était celui qui prédisait le mieux la survenue du décès, tandis que la distance UniFrac non pondérée était l'indice de diversité beta ayant les meilleures capacités prédictives.

Les perspectives de ce travail sont d'étudier l'évolution des indices de diversité du microbiote intestinal chez l'homme après une perturbation antibiotique.

Paysage adaptatif des bêta-lactamases

Hervé JACQUIER – Université Paris Diderot – Hôpital Lariboisière

BIOGRAPHIE

Ancien interne en biologie médicale, Hervé JACQUIER est spécialisé en microbiologie médicale dans le domaine du diagnostic et de l'évolution de la résistance aux antibiotiques. Il est actuellement MCU-PH en bactériologie à l'UFR de Médecine de l'Université Paris-Diderot et travaille au laboratoire de bactériologie médicale de l'Hôpital Lariboisière et dans l'équipe QEM (IAME UMR 1137) où il s'intéresse à l'évolution de la résistance aux bêta-lactamines.

RÉSUMÉ

La mobilisation, la diversification et la diffusion massive de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, ont conduit à l'émergence de bactéries multi-résistantes pour lesquelles de moins en moins d'antibiotiques actifs sont disponibles. Afin de mieux comprendre comment un gène de résistance aux antibiotiques répondra à l'action de la sélection naturelle, il nous paraît donc important de placer l'analyse de la résistance aux antibiotiques dans une perspective évolutive. De ce fait, la bêta-lactamase TEM-1 est un excellent modèle à plusieurs titres : (i) TEM-1 est probablement la bêta-lactamase la plus répandue dans les bactéries d'intérêt médical, (ii) l'émergence de mutations ponctuelles dans le gène codant l'enzyme TEM-1 a permis d'élargir son spectre de résistance, restreignant drastiquement l'arsenal thérapeutique, (iii) il s'agit d'une enzyme dont les propriétés enzymatiques, structurales, et thermodynamiques ont été largement explorées et qui s'est donc imposée comme un modèle d'enzyme pour les biologistes de l'évolution.

Nous avons donc développé dans notre laboratoire plusieurs approches permettant de comprendre l'évolution des bêta-lactamases. Dans des précédents travaux, nous avons réalisé une banque de 10.000 mutants de TEM-1, séquencé chaque mutant indépendamment par méthode Sanger, déterminé l'effet des mutations par mesure de la concentration minimale inhibitrice de l'amoxicilline. Ces travaux nous ont permis de confronter ces résultats obtenus *in vitro* à des modèles de prédiction d'effet des mutations *in silico*. Ainsi, nous avons montré que la stabilité et le fond génétique dans lequel survient une mutation jouent un rôle central dans l'évolution de ces enzymes.

Pour aller plus loin dans la compréhension de ces phénomènes, nous avons transposé cette problématique à une autre bêta-lactamase, CTX-M-15, moins étudiée par les biologistes de l'évolution. Cette enzyme est importante en microbiologie clinique, car, elle présente un spectre élargi aux céphalosporines de 3^{ème} génération, et a connu une diffusion pandémique chez les entérobactéries, en particulier *Escherichia coli*. L'étude de ces mutations nous a permis de comprendre les propriétés évolutives communes et variables entre ces deux enzymes et de mettre en évidence des interactions intervenant localement ou de façon plus globale chez ces deux protéines.

Enfin, si beaucoup d'étude se sont intéressées à l'évolution de ces enzymes vis-à-vis de l'hydrolyse des céphalosporines de 3^{ème} génération, peu de travaux se sont intéressés à la résistance des enzymes aux inhibiteurs de bêta-lactamases (IBL), dont la diffusion a connu un moindre succès épidémique. Cette observation peut être liée d'une moindre diffusion des gènes codant ces enzymes dans des bactéries d'intérêt médicale, ou aux contraintes évolutives intrinsèques de ces gènes, auxquelles nous nous sommes intéressés. Le variant TEM-33, un allèle de TEM-1 portant la mutation M69L, est associé à une résistance à cette classe de molécules.

Cette mutation est responsable d'une moindre flexibilité du site actif, entraînant une baisse de l'activité catalytique de l'enzyme, affectant de façon beaucoup plus importante les inhibiteurs que les bêta-lactamines. Dans des études en cours, nous avons donc réalisé des banques de mutants de TEM-1 et TEM-33 en utilisant une méthode de mutagenèse quasi-exhaustive, et étudié « en bulk » la fréquence des mutants par séquençage à haut-débit après sélection par différentes concentrations d'amoxicilline et de ceftazidime. Ces travaux montrent que la présence de cette mutation M69L modifie de manière considérable le paysage adaptatif de l'enzyme.



Le foisonnement fécond des initiatives internationales de recherche pour lutter contre l'antibiorésistance !

Antoine ANDREMONT – Professeur émérite, Faculté de Médecine – Université Paris-Diderot

BIOGRAPHIE

Antoine Andremont est pédiatre et a réalisé l'essentiel de sa carrière en microbiologie médicale avec un intérêt particulier pour la façon dont la résistance des bactéries aux antibiotiques évoluait au sein du microbiote intestinal. Il est actuellement Professeur émérite à la faculté de médecine de l'université Paris-Diderot et membre du groupe d'experts AGISAR de l'OMS et actif dans diverses instances internationales de recherche.

RÉSUMÉ

Dans les années 80 on a cru que la lutte contre les infections bactériennes était définitivement gagnée car on disposait de nombreux antibiotiques très actifs et d'un certain nombre de vaccins. La recherche dans ce domaine s'est en pratique arrêtée. Cependant durant la période suivante l'utilisation abusive des antibiotiques dans tous les domaines de la médecine et de l'agriculture s'est accrue, en partie à la suite de l'apparition de très nombreux génériques très bons marchés. La prise de conscience s'est faite depuis 5-8 ans, progressivement, et a maintenant atteint les plus hauts niveaux de la gouvernance mondiale. Depuis 2-3 ans les initiatives se multiplient pour revitaliser les voies de recherche abandonnée et en explorer de nouvelles. L'Europe a clairement montré le chemin mais désormais de nombreuses autres nations ont rejoint le mouvement. Un foisonnement d'organismes et d'acronymes envahissent le domaine dans lesquels il n'est pas facile de se repérer. Je tenterai un exercice de typologie dynamique de ces événements pour aider les acteurs impliqués dans ce domaine à trouver le meilleur chemin pour que leur action contribue au succès des politiques destinées à combattre l'antibiorésistance.



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)