



HAL
open science

Impact de l'administration systémique de minocycline et de polymyxine B sur la sélection de résistance dans la flore digestive chez le porc

Aymelle Slim

► To cite this version:

Aymelle Slim. Impact de l'administration systémique de minocycline et de polymyxine B sur la sélection de résistance dans la flore digestive chez le porc. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04160549

HAL Id: dumas-04160549

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04160549v1>

Submitted on 12 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

IMPACT DE L'ADMINISTRATION SYSTEMIQUE DE MINOCYCLINE ET DE POLYMYXINE B SUR LA SELECTION DE RESISTANCE DANS LA FLORE DIGESTIVE CHEZ LE PORC

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

SLIM Aymelle

Directrice de thèse : Mme Aude FERRAN

JURY

PRESIDENTE :
Mme Peggy GANDIA

Professeure à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Aude FERRAN
M. Alain BOUSQUET-MELOU

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITEE :
Mme Véronique DUPOUY

Ingénieure de Recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de
TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales règlementées*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie Pathologique*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

Remerciements

A Madame la Professeure Peggy Gandia

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Responsable du Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie

Qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Sincères remerciements

A Madame la Professeure Aude Ferran

Professeur de l'Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse

Physiologie -Thérapeutique

Qui a accepté la direction de cette thèse, pour sa patience et son aide précieuse. Pour ses réponses toujours aussi rapides et claires, pour avoir partagé ses connaissances et avoir toujours été disponible. L'avoir pour directrice de thèse a été un réel plaisir.

Merci infiniment

A Monsieur le Professeur Alain Bousquet-Melou

Professeur de l'Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse

Pharmacologie - Thérapeutique

Qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Sincères remerciements

A Madame le Docteur Véronique Dupouy

Ingénieur de recherche à l'Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse

Pour sa précieuse contribution à la réalisation des manipulations, pour ses conseils au commencement de cette thèse et lors du traitement des résultats.

Sincères remerciements

A ma famille, pour m'avoir toujours soutenue et avoir cru en moi,

*A mes parents que j'aime de toutes mes forces et qui ont toujours été là, de près
comme de loin.*

Sommaire

Sommaire	1
Tables des illustrations	5
Introduction	7
I. Antibiotiques et antibiorésistance	8
A. Découverte des antibiotiques et leur utilisation	8
B. Émergence de l'antibiorésistance	8
C. Stratégies pour limiter l'expansion de l'antibiorésistance	11
1. Premier objectif : Mieux faire connaître et comprendre le problème de la résistance aux antimicrobiens grâce à une communication, une éducation et une formation efficaces.....	12
2. Deuxième objectif : Renforcer les connaissances et les bases factuelles par la surveillance et la recherche	13
3. Troisième et quatrième objectifs : Réduire l'incidence des infections par des mesures efficaces d'assainissement, d'hygiène et de prévention des infections et optimiser l'utilisation des antimicrobiens en santé humaine et animale	14
4. Dégager les arguments économiques en faveur d'investissements durables qui tiennent compte des besoins de tous les pays et accroître les investissements dans la mise au point de nouveaux médicaments, outils diagnostiques, vaccins et autres interventions	16
II. Dissémination de bactéries résistantes dans l'environnement	17
A. Gènes de résistance : émergence et mécanismes de transmission.....	17
1. Emergence des gènes de résistances	17

2.	Mécanismes biologiques de transmission des résistances entre bactéries	19
3.	Effet des antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices	22
B.	Sélection des gènes de résistance	23
1.	Fenêtre de sélection.....	23
2.	Notion de coût adaptatif	24
C.	Les principales voies d'exposition de l'homme aux bactéries résistantes	24
1.	Transmission par contact entre individus	24
2.	Réservoirs environnementaux.....	25
III.	Impact des traitements antibiotiques sur la flore digestive commensale	27
A.	Composition de la flore digestive humaine.....	28
B.	Effets indésirables des antibiotiques sur la flore digestive commensale	28
1.	Voies d'entrées des antibiotiques dans le tube digestif.....	29
2.	Dysbioses.....	30
3.	Résistances.....	32
IV.	Description de l'association de molécules et objectif de l'étude	34
A.	Préalable.....	34
1.	Bactéries ciblées et choix de la thérapie combinée.....	34
2.	Développement de combinaisons de molécules CO-ACTION	36
3.	Dose et voie d'administration	37
B.	Propriétés des deux antibiotiques utilisés : la Minocycline et la polymyxine B .	37
1.	Minocycline	37
2.	Polymyxine B	40
C.	Objectif de l'étude	43
V.	Matériel et méthodes	44

A.	Protocole.....	44
1.	Plan expérimental	44
2.	Modalités d'analyses microbiologiques des échantillons	45
3.	Modalités de collectes des échantillons et traitements immédiats	47
B.	Choix du porc comme modèle d'étude.....	49
1.	Comparaison des tractus intestinaux et de leur composition	49
2.	Choix de la dose à administrer aux porcelets.....	50
VI.	Résultats.....	52
A.	Etude descriptive.....	52
1.	Evolution du nombre total de bactéries au cours de l'étude.....	53
2.	Evolution des proportions d' <i>Entérobactérales</i> résistantes à la minocycline au cours du traitement.....	54
3.	Comparaison des différentes phases.....	55
4.	Evolution du nombre total pour chaque porc en fonction des jours.....	56
B.	Etude statistique des effets observés entre les jours 1 à 18	58
1.	Etude statistique des nombres totaux de bactéries.....	58
2.	Etude statistique des nombres de bactéries résistantes	59
3.	Etude statistique des proportions de bactéries résistantes	60
C.	Etude statistique des effets observés entre les jours 1 à 6	61
1.	Etude statistique des nombres totaux de bactéries.....	61
2.	Etude statistique des nombres de bactéries résistantes	62
3.	Etude statistique des proportions de bactéries résistantes	63
VII.	Discussion	66
A.	Effet de la minocycline sur les Entérobacterales fécales	66
1.	Concentrations en minocycline dans le tractus digestif et hypothèses de départ.	

2.	Exposition réelle de la flore intestinale à la minocycline.....	69
B.	Limites de l'étude	70
1.	Consistance des selles	70
2.	Méthode d'évaluation de l'émergence et de la sélection de résistance des souches bactériennes issues de la flore des porcs traités.....	71
VII.	Conclusion.....	72
VIII.	Bibliographie.....	74

Tables des illustrations

Figure 1 : Représentation de la structure chimique de la minocycline	38
Figure 2 : Structure chimique de la polymyxine B	41
Figure 3 : Concentrations plasmatiques en minocycline en fonction du temps chez le porc	51
Figure 4 : Représentation des Logtot de tous les porcs (P2 et P3 réunies) en fonction des jours	53
Figure 5 : Histogramme de LogPropor des trois groupes de porc de la phase 2 et 3 en fonction des jours	55
Figure 6 : Représentation graphique de LogPropor et LogMino, des phases P2 et P3, pour tous les porcs en fonction des jours	56
Figure 7 : LogTot de chaque individu en fonction des jours avec leurs courbes de régression linéaire (en noire).....	57
Figure 8 : Paramètres d'intérêt du modèle LogTot	59
Figure 9 : Paramètres d'intérêt du modèle LogTot de J1 à J6.....	61
Figure 10 : Représentation graphique du modèle LogTot sur J1 à J6.....	62
Figure 11 : Paramètres d'intérêt du modèle LogPropor de J1 à J6	64
Figure 12 : Représentation finale du modèle LogPropor de J1 à J6	65
Figure 13 : Concentrations en minocycline dans le plasma et les différents segments du tube digestif après administration intraveineuse de 8mg/kg de minocycline à des porcs..	
Figure 14 : Courbes de bactéricidies d'inoculum d'Escherichia coli en présence de concentrations différentes de minocycline dans un bouillon MH et dans du contenu intestinal stérilisé iléal.....	69
Figure 15 : Diagramme en boîte de Logpropor entre J1 et J6.....	72
Tableau 1 : Chronologie de l'apparition de cas d'antibiorésistances à un antibiotique par rapport à sa date de mise sur le marché	9
Tableau 2 : Comparaison des facteurs Phase	60

Tableau 3 : Comparaison deux à deux des facteurs doses.....	60
Tableau 4 : AIC et BIC des deux modèles créés.....	64
Tableau 5 : Comparaison des groupes HD, LD et T deux à deux	64

Introduction

Les antibiotiques sont des composés chimiques, naturels ou synthétiques, qui tuent ou empêchent la croissance de bactéries. Lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné et qu'elles ne font pas partie de son « spectre d'activité », on parle de résistance intrinsèque/naturelle. Nous ne nous intéresserons dans cette thèse qu'aux résistances acquises par des espèces bactériennes sensibles à l'état « sauvage ».

L'antibiorésistance, d'un point de vue microbiologique, est la capacité d'une bactérie à résister à antibiotique, la rendant ainsi moins sensible à son action que d'autres souches de la même espèce dépourvues de tout mécanisme de résistance. Ces mécanismes sont principalement associés à des modifications génétiques. L'antibiorésistance est due à l'expression de gènes de résistances bactériens qui sont portés aussi bien par des bactéries pathogènes que commensales. Ces gènes peuvent, pour certains, être transmis à d'autres bactéries pathogènes ou commensales retrouvées chez l'Homme, les animaux ou dans l'environnement ; la lutte contre la résistance antibiotique s'inscrit alors dans une approche « One Health »¹.

D'un point de vue clinique, l'antibiorésistance correspond à la persistance de l'infection chez un patient malgré l'utilisation de l'antimicrobien adéquat à la posologie recommandée. C'est aujourd'hui l'une des menaces principales de la santé publique mondiale car elle limite les possibilités de traitement des infections et entraîne une hausse de la mortalité. D'après le rapport publié en 2016 par l'économiste britannique Jim O'Neill la résistance aux anti-infectieux pourrait devenir la première cause de décès d'ici 2050 si aucune mesure n'était mise en place d'ici là. Suite à ce constat des projets de recherche ont été financés pour lutter contre l'apparition et la sélection de résistances aux antibiotiques. C'est dans le cadre de ces recherches que s'inscrit cette thèse expérimentale.

¹ « Une seule santé »

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'impact de différentes doses d'une nouvelle association prometteuse d'antibiotiques (polymyxine B/Minocycline), sur le microbiote de porcs, un modèle d'étude pour l'Homme.

I. Antibiotiques et antibiorésistance

A. Découverte des antibiotiques et leur utilisation

La découverte des antibiotiques au début du 20^{ème} siècle a été l'une des plus importantes de la médecine, grâce à elle, l'espérance de vie humaine a été prolongée d'une vingtaine d'années. Le premier usage des antibiotiques fut celui de la pénicilline en 1941, puis pendant 20 ans, de 1940 à 1960 s'est écoulé « l'âge d'or » des antibiotiques. Durant cette période les quinze familles d'antibiotiques utilisées aujourd'hui ont été découvertes et ont été classées selon leur mode d'action et leur structure chimique. Depuis, la consommation mondiale d'antibiotiques n'a cessé d'augmenter et a atteint une hausse de 65% au début des années 2000 (1), cette hausse est à l'origine d'inquiétudes pour les chercheurs. En effet l'augmentation d'utilisation des antibiotiques provoque l'émergence de résistances à ces antibiotiques (2), à tel point que l'Organisation mondiale de la santé a établi en 2017 que l'antibiorésistance était l'une des dix plus grandes menaces pour la santé publique auxquelles se trouvait confrontée l'humanité.

B. Émergence de l'antibiorésistance

En 1945 Alexander Fleming avait déjà soulevé le problème de la mauvaise utilisation des antibiotiques et avait émis l'hypothèse que leur sur-prescription « apprendrait aux microbes à résister à la pénicilline » (3). En effet en 1940, seulement douze ans après sa découverte, les premiers cas de non réponse au traitement avec des pénicillines ont été identifiés. Il en est de même pour la tétracycline mise sur le marché en 1950 et dont les premiers cas d'antibiorésistance ont été identifiés neuf ans plus tard (Tableau 1) (4). Ce phénomène se répète pour tous les antibiotiques, seule la durée entre

leur introduction sur le marché et l'émergence et la dissémination de pathogènes résistants à ceux-ci est variable. De plus, lorsque des antibiotiques appartiennent à la même famille, la résistance à un antibiotique entraîne souvent une résistance à tous les antibiotiques apparentés.

Il existe aujourd'hui des bactéries dites multirésistantes (BMR), qui ont accumulé des gènes de résistance à au moins trois familles d'antibiotiques et pour lesquelles la mise en place de traitements efficaces devient de plus en plus difficile.

Tableau 1 : Chronologie de l'apparition de cas d'antibiorésistances à un antibiotique par rapport à sa date de mise sur le marché

Molécule	Année d'introduction sur le marché	Année d'apparition de cas d'antibiorésistance
Pénicilline	1943	1940 - Staphylocoques résistants à la pénicilline 1965 – pneumocoques résistants à la pénicilline
Tétracycline	1950	1959 - <i>Shigella</i> résistantes à la tétracycline
Erythromycine	1953	1968 - Streptocoques résistants à l'érythromycine
Méthicilline	1960	1962 - Staphylocoques résistants à la méthicilline
Gentamycine	1967	1979 - Entérocoques résistants à la gentamycine
Vancomycine	1972	1988 - Entérocoques résistants à la vancomycine 2002 - Staphylocoques résistants à la vancomycine
Imipenem et ceftazidime	1985	1987 – Entérobactérales

		résistants à la ceftazidime 1998 – Entérobactériales résistants à la l'imipenem
Levofloxacin	1996	1996 – Pneumocoques résistants à la levofloxacin
Linézolide	2000	2001 - Staphylocoques résistants au linézolide

Source : Ventola CL : « *The Antibiotic Resistance Crisis* ».

Parmi les BMR les plus répandues dans le monde et faisant l'objet d'une surveillance et d'un contrôle spécifique on retrouve les SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la métiline) ainsi que les EBLSE (entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu). Ils ont été les premiers acteurs de la crise mondiale à laquelle nous sommes confrontés et sont dans de nombreux pays désignés comme BMR prioritaires. Apparus en 1962, les SARM étaient initialement des germes nosocomiaux qui ont émergé en Angleterre avant de se répandre de façon épidémique dans tous les hôpitaux à l'échelle nationale, ces clones (souches ayant un ancêtre commun) SARM dénommés HA-SARM (pour Hospital-Acquired) se sont ensuite répandus mondialement. A la fin des années 90 de nouveaux clones ont émergés sans lien avec les HA-SARM et cette fois-ci, dans la communauté ; ils ont été dénommés CA-SARM (Community-Acquired). Plus récemment, des complexes clonaux à large spectre d'hôtes nommés les LA-SARM (Livestock-Associated) touchant aussi bien les humains que les animaux se répandent dans les élevages et sont systématiquement porteurs de résistances aux tétracyclines (5). Malgré la rapidité et l'étendue de la diffusion des SARM, des études épidémiologiques ont montré que les procédures mises en place pour limiter voire faire régresser leur dissémination étaient efficaces. Une diminution significative de leur incidence en Europe a été notée entre 2016 et 2020 ce qui est loin d'être le cas de celle

des BMR à Gram négatif (6) telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* et *E. coli* qui sont les plus fréquemment identifiées comme porteuses de β -lactamases à spectre étendue (BLSE). Leur dissémination devient hors de contrôle bien que des mesures identiques à celles des SARM aient été appliquées. Les raisons principales qui expliquent cette différence sont : la taille de l'inoculum bactérien des individus infectés qui est 100 fois plus élevée lors d'infection par des *E. coli* BLSE que par des SARM mais aussi une différence de sites de portages, en effet on retrouve majoritairement les *E. coli* dans les fèces et les urines dans lesquelles leur taux d'excrétion atteint 10^{10} bactéries par jour tandis que la dissémination des SARM est limitée du fait de leur sites de portages (rhinopharynx, peau et abcès majoritairement) et de leur taux d'excrétion plus faible (7).

L'âge d'or des antibiotiques a donc pris fin avec l'émergence des BMR au début des années soixante mais aussi avec le fort ralentissement de la recherche de nouveaux antibiotiques par les entreprises pharmaceutiques du fait de leurs faibles rentabilités (les antibiotiques sont des médicaments utilisés pendant des périodes courtes et sont moins rentables que les médicaments destinés aux maladies chroniques). De plus, du fait des résistances, lorsqu'un nouvel antibiotique est mis sur le marché, son usage est souvent règlementé pour n'être utilisé qu'en dernière intention, cette pratique permet de réduire l'apparition de résistance mais est problématique pour les entreprises pharmaceutiques car elle entraîne une diminution du retour sur investissement. La crise mondiale à laquelle nous sommes confrontés est donc une corrélation entre la rapidité d'apparition et de dissémination des résistances et au manque de développement de nouveaux agents antibiotiques.

C. Stratégies pour limiter l'expansion de l'antibiorésistance

En mai 2015, suite à la constatation de la propagation de BMR dans le monde entier l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a adopté en coordination avec l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) un plan d'action mondial qui se décompose en cinq objectifs. L'année suivante, le G7 a créé le réseau « One health »

qui regroupe la santé publique, animale et environnementale et qui permet de coordonner les actions des états membres.

1. Premier objectif : Mieux faire connaître et comprendre le problème de la résistance aux antimicrobiens grâce à une communication, une éducation et une formation efficaces

La lutte contre l'antibiorésistance concerne aussi bien les fabricants, les prescripteurs, les utilisateurs et les consommateurs, chacun à son niveau doit contribuer à diminuer l'utilisation des antibiotiques. Le premier objectif est d'abord de sensibiliser la population à l'antibiorésistance. A cette fin, chaque année, l'OMS organise une semaine mondiale de sensibilisation aux antimicrobiens du 18 au 24 novembre au cours de laquelle les nouvelles campagnes de sensibilisation sont diffusées à travers tous les médias disponibles (réseaux sociaux, télévision, radio, internet) mais aussi dans tous les établissements de santé (pharmacies, laboratoires, cabinets vétérinaires, cabinets médicaux) sous formes d'affiches et dépliants, de vidéos et de GIFs et de slogans de sensibilisation, celui de 2021 étant « spread awareness, stop resistance ». Cette sensibilisation peut avoir un réel impact sur le bon usage des antibiotiques, on l'a vu en France au début des années 2000 avec le slogan « Les antibiotiques, c'est pas automatique » qui avait été lancé par la Sécurité sociale et qui avait marqué les esprits pendant plus de 10 ans. Suite à son lancement, une baisse de 23% de la consommation des antibiotiques avait été observée en cinq ans, avant malheureusement de repartir à la hausse. Malgré un résultat probant à court terme les efforts de sensibilisation doivent être maintenus, en 2017 en France, seulement un français sur deux connaissait le terme d'antibiorésistance et 36% en avait entendu parler mais ne savait pas à quoi il correspondait (8). La sensibilisation passe aussi par un renforcement de l'éducation des élèves de tout âge mais aussi des praticiens prescripteurs. En Europe la plateforme e-Bug a été mise en place et fournie des leçons gratuites pour les élèves allant de 3 à 16 ans sur les microbes et l'utilisation des antibiotiques, des formations pour professionnels

praticiens sont également disponibles sur le site du Centre Européen de prévention et contrôle des maladies (ECDC). En France la formation initiale et continue des professionnels de santé a également été renforcée, l'antibiorésistance est maintenant l'une des thématiques prioritaires de l'agence nationale du développement professionnel continu (DPC) et un budget de 7 millions d'euros a été dédiée à sa prévention sur la période 2021-2023.

2. Deuxième objectif : Renforcer les connaissances et les bases factuelles par la surveillance et la recherche

Afin de favoriser la communication entre les états membres de l'OMS et de permettre le partage d'informations normalisées rapidement, le Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens GLASS (GLobal Antimicrobial Resistance Surveillance System) a été créé en 2015. Il permet de collecter et d'analyser les données transmises et de fournir des données comparables et normalisées de la situation de chaque pays membre concernant la résistance aux antibiotiques. La comparaison précise des taux de résistances a été permise par l'instauration de paramètres tels que l'ECOFF (epidemiological cut-off value) qui permet de fixer la CMI (concentration minimale inhibitrice) la plus élevée pour les organismes dépourvus de mécanismes de résistances (aussi appelés « souches sauvages ») : les organismes sont considérés comme résistants lorsque leur CMI est supérieure à l'ECOFF. Les ECOFFs sont des composants indispensables de la surveillance internationale car elles ne dépendent ni du pays, ni de l'hôte (humain, animal, environnemental) ni de la date du recueil des souches, elles sont déterminées par le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) aux USA, ou par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en Europe et ont été reconnues par l'OMS et l'OIE. Grâce au GLASS, on peut estimer l'étendue de la résistance aux antibiotiques à l'échelle mondiale et évaluer l'efficacité des plans d'actions mis en place à l'échelle mondiale et nationale. Il permet également de détecter les nouvelles résistances, d'identifier leurs réservoirs et de mettre en place des mesures afin d'empêcher leur propagation au niveau national et

international. Tous les agents pathogènes n'y sont pas reportés, seuls les agents résistants considérés comme prioritaires y figurent. En 2016, seulement quarante-deux états étaient adhérents au GLASS tandis qu'aujourd'hui cent-neufs fournissent leurs données concernant les BMR circulants dans leur pays dont 18 fournissant également des données sur leur consommation en antibiotiques.

La recherche est également au cœur du plan d'action mondial, elle se découpe en plusieurs axes : la recherche s'appuyant sur des études cliniques afin de promouvoir un usage responsable des antibiotiques et limiter l'apparition de résistance (nécessité du traitement, durée du traitement, posologie, choix de la molécule), la recherche de nouveaux traitements, outils diagnostiques, vaccins... Cette recherche est financée et structurée à l'échelle mondiale par le JPI-AMR (Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance) qui est un programme auquel vingt-neuf pays sont adhérents et dans lequel cent vingt-cinq millions d'euros ont été investis. A ce jour, près de quatre-vingt-dix-neuf projets ont été menés à bien par le JPI-AMR et de nouveaux projets sont financés tous les ans. Le projet CO-ACTION dans lequel s'intègre cette thèse expérimentale est un des projets internationaux financé par le JPI-AMR.

3. Troisième et quatrième objectifs : Réduire l'incidence des infections par des mesures efficaces d'assainissement, d'hygiène et de prévention des infections et optimiser l'utilisation des antimicrobiens en santé humaine et animale

Une bonne hygiène ainsi que des mesures de préventions adéquates sont indispensables pour limiter la propagation des infections et limiter l'utilisation des antibiotiques. La majorité des infections aux BMR étant nosocomiales, il a été nécessaire de renforcer les mesures d'hygiène dans les établissements de santé. En France, RéPias (le Réseau de Prévention des Infections Associées aux Soins) et l'Agence nationale de santé publique proposent des outils de formations et de communication destinés aux

professionnels et aux particuliers. Concernant les établissements de santé ils doivent posséder une certification pour la qualité des soins à renouveler tous les quatre ans et répondant aux critères fixés par la Haute Autorité de Santé (HAS).

En 2020 lors de la pandémie COVID-19, le respect des gestes barrières a montré son efficacité, on a observé une baisse de 18% de la consommation des antibiotiques en France mais également en Europe où la diminution n'avait jamais été aussi importante (9). Cette diminution s'explique par la baisse de prescriptions du fait du confinement et de la diminution du nombre de consultations médicales, mais elle s'explique également par la diminution de la transmission des infections courantes grâce au port du masque, à la bonne hygiène des mains et à la distanciation sociale.

L'optimisation de l'utilisation des antibiotiques passe par la mise en place de réglementations en médecine humaine mais aussi en médecine vétérinaire : en France le décret n°2016-1788 datant du 1^{er} avril 2017 oblige les vétérinaires à transmettre leurs données lors de cession de médicament comportant une substance antibiotique au ministère de l'agriculture par voie électronique mais la mise en œuvre a été retardée par des problèmes techniques de transmission des données. Le décret de mars 2016 a interdit l'usage de certains antibiotiques identifiés comme critiques pour la santé humaine et pour d'autres, a limité leur emploi avec une liste de conditions et de consignes à respecter, tout non-respect étant passible d'amendes et même d'emprisonnement.

En Europe un nouveau règlement (UE) 2019/6 entré en vigueur en janvier 2022 a fourni une nouvelle liste de restrictions applicables à tous les pays de l'Union. L'OMS effectue un suivi des lois et des réglementations mis en place dans chaque pays adhérent notamment grâce à l'enquête annuelle tripartite d'auto-évaluation des pays sur la résistance aux antimicrobiens (TrACSS). On peut donc voir que seulement 8% (13 pays sur 161) des pays adhérents avaient répondu NON à la question 5.4.1 : « Le pays a des lois ou des réglementations sur la prescription et la vente d'antimicrobiens à usage humain ».

4. Dégager les arguments économiques en faveur d'investissements durables qui tiennent compte des besoins de tous les pays et accroître les investissements dans la mise au point de nouveaux médicaments, outils diagnostiques, vaccins et autres interventions

L'objectif ici est de motiver la mise en place de plans d'actions en avançant des critères économiques, à l'échelle nationale. De nombreuses études ont permis de mesurer l'impact économique de l'antibiorésistance et de comparer le coût de l'inaction avec le coût de la mise en place des plans internationaux et nationaux contre la résistance aux antimicrobiens. L'objectif est aussi de récolter les fonds nécessaires et de développer des partenariats afin de permettre la recherche d'alternatives à la consommation d'antibiotiques. L'OMS a dans ce but créé conjointement avec la DNDi (Drugs for Neglected Disease initiative) le Partenariat Mondial pour la Recherche et le Développement d'antibiotiques (GARDP). Cette ONG réunit des partenaires publics et privés de près de 15 pays différents et prévoit de développer quatre nouveaux traitements d'ici 2023 via des antibiotiques déjà existants et via la création de nouveaux antibiotiques.

L'OMS a également créé le Groupe de Coordination Interinstitutions sur la résistance aux Antimicrobiens (IACG) pour coordonner les actions de toutes les organisations précédemment citées et de s'assurer de l'efficacité de l'action mondiale contre l'émergence et la dissémination de bactéries résistantes dans l'environnement.

II. Dissémination de bactéries résistantes dans

l'environnement

Les antibiotiques sont, pour la grande majorité, des composés naturels qu'on retrouve dans l'environnement, la pénicilline par exemple est produite par les champignons du genre *Penicillium*. La résistance aux antibiotiques est également un phénomène que l'on retrouve dans l'environnement. Des résistances existaient bien avant l'utilisation des antibiotiques par l'homme, des forages du permafrost ont d'ailleurs mis en évidence des gènes de résistances portés par des bactéries datant d'il y a 40 000 ans (10). Les bactéries se sont toujours adaptées afin de survivre dans des conditions environnementales hostiles grâce à des mécanismes de formation de biofilms mais aussi grâce à l'expression de gènes qu'elles portent sur leur ADN chromosomique ou plasmidique.

A. Gènes de résistance : émergence et mécanismes de transmission

1. Emergence des gènes de résistances

a) Mutations génétiques et classement des résistances

Les bactéries sont des micro-organismes procaryotes dont l'ADN est porté par un chromosome circulaire situé dans leur cytoplasme, elles possèdent aussi souvent des plasmides qui sont de petites molécules d'ADN circulaires qui ne sont pas forcément transmis aux cellules filles. La résistance des bactéries aux antibiotiques est permise par l'acquisition de gènes de résistances ou par mutation pendant le mécanisme réplication de l'ADN. Ces mutations sont spontanées et rares mais peuvent aussi être induites par

des agents mutagènes, la majorité des antibiotiques utilisés ne sont pas des agents mutagènes ils ne sont donc pas à l'origine de l'émergence des gènes de résistances mais ils participent à leur sélection (11). Les résistances sont dites « passives » lorsqu'il y a modification de la cible de l'antibiotique (ex : mutation des protéines sur laquelle se fixe l'antibiotique) ou diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (mutations des transporteurs, systèmes d'efflux). Les résistances sont dites « actives » lorsque la mutation permet la destruction de l'antibiotique (12). La résistance ne dépend pas seulement du portage de gènes de résistance, elle dépend également de leur niveau d'expression. Certains gènes peuvent conférer une résistance lorsqu'ils sont surexprimés chez certaines bactéries (mutation du promoteur, grand nombre de copies du plasmide possédant le gène, etc.) tandis qu'ils n'induisent pas de résistance chez les bactéries qui ne sont pas capables de les surexprimer (13). Les gènes de résistances ont donc été classés avec (14) :

- d'une part les gènes dont l'acquisition par transferts horizontaux (résistances acquises) ou verticaux (résistances intrinsèques) confère à la bactérie une résistance cliniquement détectable
- d'autre part les gènes dont le portage n'implique pas de résistance clinique, avec les gènes silencieux (seules leur expression ou leur surexpression confère une résistance clinique) et les gènes protorésistants (une mutation sur ces gènes confère une résistance clinique) (15).

L'ensemble des gènes de résistances présents chez les bactéries pathogènes et non pathogènes constituent le résistome.

b) Notion de résistome

Le résistome est un terme utilisé pour la première fois par le scientifique Gerard D. Wright qui désigne l'ensemble des gènes de résistances portés par l'ensemble des bactéries pathogènes et non pathogènes d'un système. Ces gènes circulent entre les microbiomes humains, animaux et environnementaux qui sont de véritables réservoirs de résistances. La communication et l'interdépendance de ces trois sphères est à la base du concept « One-health » qui contribue à la surveillance de la résistance dans tous les

écosystèmes.

2. Mécanismes biologiques de transmission des résistances entre bactéries

L'acquisition d'un gène de résistance peut se faire par mutation d'un gène préexistant mais peut également se faire par transfert de gènes entre bactéries. Lorsque la mutation est localisée sur un gène chromosomique, le transfert de gènes est uniquement vertical. Dans ce cas la résistance est transmise à toute la descendance de la bactérie mais la transmission reste restreinte car elle est limitée à une seule lignée de bactéries. Le transfert peut également être horizontal lorsque le gène est localisé sur un élément génétique mobile (plasmides, transposons ou intégrons). Dans ce cas l'information génétique peut s'échanger au sein d'un large panel de bactéries d'espèces, de pathogénicités et d'origines différentes (16). Les transferts horizontaux sont responsables de la diversité génétique bactérienne mais aussi de la dissémination des gènes de résistance par différents mécanismes : la conjugaison, la transformation et la transduction.

a) Les éléments génétiques mobiles

Les éléments génétiques mobiles sont des portions d'ADN qui peuvent être échangés entre cellules bactériennes par transferts horizontaux, ils ne sont pas indispensables au métabolisme de la bactérie mais peuvent le devenir lorsque les conditions du milieu changent (ex : présence d'un antibiotique).

Parmi ces éléments on retrouve les plasmides qui sont des molécules d'ADN circulaires (parfois linéaires) double brin de petite taille, ils se répliquent indépendamment du chromosome bactérien et ont leurs propres unités de réplifications (réplicons), il peut donc y avoir des centaines de copie d'un même plasmide dans une bactérie (17). Les plasmides peuvent être transmis lors de transferts verticaux mais ne sont pas toujours transmis aux cellules filles de manière équitable, leur mode de transfert le plus répandu

reste le transfert horizontal et notamment la conjugaison. Certains plasmides possèdent l'information génétique permettant leur propre transfert d'une cellule à l'autre, ils peuvent aussi contenir de nombreux gènes de résistances aux antibiotiques, c'est le cas du plasmide pLW1043 qui confère une résistance au triméthoprim, à la pénicilline, à la vancomycine et à la streptomycine, il possède également des gènes de résistance à certains désinfectants (18).

Les transposons et les intégrons sont également des éléments génétiques mobiles de petite taille, mais à la différence des plasmides, ils n'ont pas la capacité de se répliquer de manière indépendante. Les transposons sont de petites portions d'ADN qui se déplacent dans le génome, ils peuvent se déplacer du chromosome bactérien à un plasmide et vice-versa. Ils possèdent des gènes codant des facteurs nécessaires à leur mouvement (transposases) et peuvent aussi posséder des gènes de résistances aux antibiotiques. L'intégron est un système d'expression et de capture de gènes sous la forme de cassettes qui sont insérées ou excisées grâce à des intégrases. Chaque intégron contient un gène codant pour une intégrase, un promoteur et des cassettes de gènes. Pour l'instant trois classes d'intégrons ont été caractérisés et les gènes de leurs cassettes codent presque exclusivement pour des gènes de résistances aux antibiotiques (19). Les intégrons peuvent également être mobiles lorsqu'ils se situent sur des éléments transposables et dans ce cas la dissémination de gènes de résistances est d'autant plus rapide.

b) Conjugaison

La conjugaison permet le transfert d'éléments génétiques mobiles (principalement des plasmides) entre deux bactéries via la formation d'une jonction interbactérienne et d'un pore permettant le passage de brins d'ADN. Ce mode de transfert met en jeu une bactérie donneuse qui possède des protéines de couplage le plus souvent codées par des gènes portés par un plasmide, ou plus rarement par le chromosome bactérien lorsqu'ils ont été intégrés au génome, et une bactérie receveuse (20). Certains plasmides sont « conjuguatifs », ils possèdent l'information génétique permettant d'effectuer leur propre transfert. Les plasmides qui ne le sont pas profitent de la jonction créée par la

bactérie pour être transférés ils sont dit « mobilisables » (21). La conjugaison représente la majorité des transferts horizontaux (22), c'est un mode de transfert relativement rapide qui ne dure que quelques minutes voire quelques heures lorsque la portion d'ADN à transférer est de taille importante (lors de transfert d'ADN chromosomique, phénomène rare). Ce transfert horizontal est modulé par des paramètres :

- génétiques, en effet deux bactéries donneuses ne conjuguent pas grâce aux systèmes d'exclusion d'entrée et d'exclusion de surface qui empêchent la formation de jonction entre bactéries possédant le même plasmide (23).
- environnementaux, des mécanismes existent tel que le quorum sensing où des molécules de signalisation sont sécrétées dans l'environnement, modifient l'expression de gènes cibles et induisent la conjugaison. Le transfert du plasmide pCF10 porteur d'un gène de résistance à la tétracycline est régulé par quorum sensing (24).

c) Transformation

La transformation est le mécanisme d'incorporation, dans le génome d'une bactérie dite « compétente », d'ADN libre provenant de cellules détruites, de particules virales ou sécrété par des cellules vivantes. La libération de plasmides ou de morceaux d'ADN chromosomiques stables dans l'environnement peut survenir lors de la lyse de bactéries par le système immunitaire ou par des antibiotiques. Les petits fragments ou plasmides peuvent rester intact même après plus de 4h libres laissant ainsi le temps à la transformation d'avoir lieu (24). La capacité à incorporer de l'ADN (compétence) de ces bactéries réside sur l'expression génétique d'un groupe de protéines permettant la transformation. Certaines bactéries sont compétentes de manière continue d'autres deviennent compétentes pendant un court laps de temps en réponse à un stress environnemental tel que la baisse de la quantité de ressources dans l'environnement, l'augmentation de la densité de bactéries ou même la présence d'un antibiotique (25).

d) Transduction

La transduction est le transfert de gènes d'une bactérie à l'autre par l'intermédiaire d'un bactériophage (virus) qui lors de l'infection de la bactérie peut encapsider ou exciser des fragments d'ADN de la bactérie par erreur. Ces phages restent infectieux mais défectifs, leur génome n'encode plus de cycle phagique. Ils peuvent toujours injecter leur matériel génétique dans les bactéries. Lors de l'infection d'une autre bactérie par le bactériophage défectif, l'ADN transporté par erreur est injecté au niveau du chromosome bactérien (ou reste sous forme de plasmide), la transduction est complète lorsque la recombinaison est homologue et que le gène inséré est transmis à toute la descendance de la bactérie. Les bactériophages sont d'importants vecteurs de gènes de résistances aux antibiotiques, une étude récente a montré près de 77% des patients ayant séjournés à l'hôpital plus de six mois avaient des bactériophages dans leur fèces possédant un ou plusieurs gènes de résistances (26), ils permettent un transfert de ces gènes sans qu'il n'y ait de contact entre les bactéries.

3. Effet des antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices

Les mutations et les transferts horizontaux sont à l'origine de la diversification et du brassage génétique chez les bactéries et permettent également la dispersion des gènes résistances. Les transferts horizontaux peuvent être induits par des stress environnementaux dont la présence d'antibiotiques (27). Il a aussi été mis en évidence que l'utilisation d'antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices, qui sont des concentrations comprises entre la concentration sélective minimale (28) (CSM²) et la CMI, entraîne l'émergence de bactéries résistantes. Ces concentrations entraînent l'activation du système de réparation SOS qui augmente la fréquence de mutations des bactéries et donc la probabilité d'apparition de résistances (29). Ces concentrations même faibles peuvent également favoriser le réarrangement des cassettes d'intégrons où les cassettes

² La CSM est la plus faible concentration en antibiotique qui donne un avantage compétitif aux souches résistantes en se basant sur leur taux de croissance.

de gènes de résistances sont rapprochées du promoteur (30). La présence d'antibiotiques en tant que résidus à des concentrations même faibles dans l'environnement favorise donc l'émergence de résistance. L'amplification des clones résistants dépend ensuite des conditions du milieu et du coût biologique de cette résistance.

B. Sélection des gènes de résistance

Dans un inoculum bactérien de taille importante, il existe des mutants spontanément résistants qui apparaissent aussi bien dans l'environnement qu'au niveau des flores commensales. Lors de l'utilisation d'un antibiotique, on modifie les conditions du milieu et on applique une pression de sélection sur les bactéries présentes, par un phénomène de sélection naturelle décrite par Darwin. Les souches sensibles sont moins avantagées que les souches résistantes qui prolifèrent alors.

1. Fenêtre de sélection

La croissance bactérienne des bactéries sensibles est totalement inhibée lorsque la concentration de l'antibiotique atteint la CMI tandis que la croissance des bactéries résistantes continue, elle n'est inhibée que si la concentration de l'antibiotique atteint la concentration prévenant les mutants (CPM). On appelle fenêtre de sélection l'intervalle entre la CMI et la CPM car il y a sélection des mutants dans cet intervalle de concentration (11). Les bactéries sensibles étant inhibées, les ressources du milieu deviennent totalement disponibles aux mutants dont la population croît alors. Le risque de sélection de résistants est plus élevé lorsque la charge bactérienne initiale est forte car dans ce cas la probabilité que des mutants soient présents dans l'inoculum bactérien est plus élevée (31). Ainsi l'utilisation d'un antibiotique à la posologie indiquée peut entraîner la sélection de résistances sur des colonies bactériennes denses.

2. Notion de coût adaptatif

L'avantage conféré par la mutation peut être quantifié par la valeur sélective (ou fitness) qui représente la contribution relative d'un génotype aux générations suivantes, la fitness dépend du milieu, elle est modifiée lorsque les conditions du milieu sont modifiées. L'apparition d'une mutation s'accompagne d'un coût adaptatif car l'expression du gène de résistance constitue une dépense énergétique qui est inutile lorsque l'antibiotique n'est plus présent dans le milieu. La fitness des mutants baisse donc en absence d'antibiotiques. Toutefois il a été mis en évidence que même lors de l'arrêt de la pression de sélection il y a majoritairement maintien des mutants dans le milieu et le retour à la sensibilité des souches résistantes n'est pas fréquent (32). Le maintien de leur fitness s'explique par l'existence de mutations compensatoires qui apparaissent conjointement aux mutations de résistances et qui permettent de réduire le coût de la résistance, elle peut aussi s'expliquer par l'existence de phénomène de régulations des gènes de résistances qui ne sont alors induits qu'en présence de l'antibiotique (33). La présence de multi-résistances peut aussi être une raison du maintien d'une fitness élevée car l'utilisation d'autres antibiotiques ou de désinfectants contribue à la sélection des mêmes bactéries possédant ce gène. Enfin le maintien d'une pression de sélection constante suite à l'utilisation répétée d'antibiotiques participe au maintien d'une fitness élevée des bactéries résistantes et à leur pérennité.

Au sein d'une population humaine, le phénomène de maintien de bactéries résistantes est plus complexe car chaque individu peut se contaminer de nouveau au contact d'un autre individu ou d'un environnement contaminé.

C. Les principales voies d'exposition de l'homme aux bactéries résistantes

1. Transmission par contact entre individus

Une voie importante d'exposition de l'homme aux bactéries résistantes est le

contact avec d'autres individus porteurs de la bactérie, qu'ils soient symptomatiques ou non. Les bactéries sont principalement manuportées et transmises par contact physique ou par dépôt sur des surfaces inertes (34). Il peut également y avoir transmission par gouttelettes ; c'est le cas lors de la colonisation des voies respiratoires par les SARM ou encore par voie oro-fécale via l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par des EBLSE (35). Les infections par des bactéries résistantes étaient traditionnellement liées aux soins et survenaient principalement dans les hôpitaux mais aujourd'hui les infections acquises dans la communauté sont de plus en plus courantes (36), le contact avec d'autres personnes mais aussi avec des animaux porteurs de bactéries résistantes participent à la dissémination des résistances (5).

2. Réservoirs environnementaux

L'environnement est un réservoir de gènes de résistances et est désigné comme une voie importante de transmission de bactéries résistantes. Plusieurs approches sont possibles afin de permettre la quantification de l'antibiorésistance dans l'environnement, une approche culturale avec une quantification des bactéries résistantes par comptage bactérien, une approche par fluorescence où les bactéries devenues résistantes via transconjugaisons sont détectées par fluorescence, et une approche moléculaire avec détection et dénombrement de gènes de résistances. Une des méthodes utilisées est notamment la quantification d'intégrons résistants de classe 1 qui est un bon indicateur d'antibiorésistance dans l'environnement. De nombreuses études ont montré qu'il y avait un enrichissement de ces intégrons dans les zones anthropisées (37). On retrouve un grand nombre de copies de gènes de résistance dans les eaux usées, les stations d'épurations, le fumier, les points d'eau, les sédiments, le sol et même dans l'air (38). Les effluents les plus riches en résistances sont les effluents d'hôpitaux, d'industries pharmaceutiques, de zones urbaines, de zones d'aquaculture et de zones d'exploitations agricoles (39), les effluents bruts (non prétraités) d'hôpitaux sont près de dix fois plus riches en copies d'intégrons que ceux des effluents bruts urbains. Les stations de traitement des eaux usées (STEU), dans lesquelles les effluents convergent, sont

considérées comme des interfaces directes entre l'homme et l'environnement. L'étude de la prolifération des résistances au niveau de ces stations est donc de premier intérêt. Les effluents bruts des STEU combinent plusieurs facteurs favorisant le transfert et la sélection de résistances avec notamment un milieu riche en nutriments, une charge bactérienne élevée (l'effluent peut contenir jusqu'à 10^{12} unités formant colonies (UFC) par jour et par équivalent habitant³) (37), et un apport continu en bactéries résistantes, métaux lourds, désinfectants et en antibiotiques. Une étude sur la composition chimique des effluents de STEU a démontré que 28% des antibiotiques retrouvés en tant que résidus avaient une concentration comprise entre la CSM (concentration sélective minimale) et la CMI (concentration minimale inhibitrice) (40), des concentrations qui sont propices à l'émergence, au transfert et à la sélection de résistances (II.A.3). Plusieurs autres études ont d'ailleurs mesuré chez les entérocoques prélevés dans les stations d'épuration des taux de résistance élevés (20-44%) à la tétracycline, à l'érythromycine et aux quinolones. Des taux de résistances similaires (10-40%) ont été mesurés chez les *E. coli* pour la tétracycline, les sulfamides et les aminopénicillines (37). Les traitements successifs de ces effluents au sein des STEU permettent de diminuer la charge bactérienne de l'ordre de 2 à 3 log mais ne réduisent pas les taux de résistance aux antibiotiques chez les entérocoques et les bactéries coliformes (41). Une étude réalisée sur seize STEU de dix pays Européens différents a montré que les effluents traités contenaient une concentration en gènes de résistances plus grande en abondance absolue que celle mesurée dans l'environnement dans lesquels ils étaient déversés (42). Toutefois cette concentration reste plus faible dans les effluents traités des STEU que dans les effluents bruts.

Les STEU produisent des boues et des effluents qui, une fois traités, sont rejetés dans le milieu naturel, les boues sont en partie épandues sur les cultures, tout comme une partie du lisier et du fumier des élevages. Les effluents sont rejetés dans l'environnement (rivières, etc) mais sont également utilisés pour l'irrigation des cultures, l'abreuvement du bétail et le remplissage de bassins destinés à la baignade.

³ Unité de mesure permettant d'évaluer la capacité d'une station d'épuration. Cette unité de mesure se base sur la quantité de pollution émise par personne et par jour. (Dictionnaire Environnement)

L'environnement est ainsi contaminé par les bactéries résistantes et on les retrouve au niveau de compartiments récepteurs tels que les eaux de surface, les sédiments et le sol. Un transfert de bactéries résistantes est possible lors de contacts avec le bétail, et moins fréquemment lors de baignades ou de consommation de crudités (43). Une contamination chronique des écosystèmes aquatiques beaucoup plus marquée a lieu dans les pays en voie de développement en raison de l'absence ou de la faible efficacité des infrastructures de traitements des eaux usées et des eaux industrielles. C'est le cas notamment en Inde et en Chine où de nombreuses industries pharmaceutiques sont implantées et où les réglementations relatives aux rejets dans l'environnement sont plus laxistes (44).

III. Impact des traitements antibiotiques sur la flore digestive

commensale

De nombreuses études ont montré que l'antibiothérapie avait un impact sur la flore digestive commensale, cet impact varie en fonction de la durée de contact, du spectre d'activité de l'antibiotique et de sa concentration dans le tube digestif. La fraction de la molécule retrouvée au niveau du tube digestif dépend de sa voie d'administration mais également de sa pharmacocinétique (absorption, distribution, excrétion, élimination). En effet lors de la distribution de l'antibiotique dans l'organisme une partie peut être sécrétée au niveau de la muqueuse digestive y compris après une voie parentérale. Le contact avec le microbiote intestinal peut avoir lieu lorsque l'excrétion de l'antibiotique se fait par voie biliaire et que celui-ci est toujours sous sa forme active. Lorsque l'administration se fait par voie orale, c'est toute la fraction non absorbée à qui se retrouve dans la lumière du tube digestif et qui peut modifier le microbiote. Cependant, dans la lumière du tube digestif, la totalité de l'antibiotique ne reste pas sous forme libre et active. L'antibiotique peut subir une dénaturation à cause des conditions du milieu (pH, enzymes,...) ou se lier au contenu digestif ce qui empêche son activité sur les bactéries. Seule la fraction libre et active peut avoir un effet sur la flore commensale.

A. Composition de la flore digestive humaine

La flore digestive commensale est un ensemble de micro-organismes (bactéries, virus, champignons non pathogènes) présents dans l'organisme et favorisant son fonctionnement. La flore intestinale bactérienne est en symbiose avec l'hôte, elle apporte des enzymes non codées par le génome de l'hôte qui permettent un apport en nutriments indispensables à son fonctionnement tout en utilisant les ressources disponibles pour leur croissance. La flore digestive commensale est constituée de près de 10^{14} bactéries appartenant à près de mille espèces différentes, les deux phyla de bactéries prédominantes sont les Firmicutes qui sont des bactéries anaérobies à Gram positif et les Bacteroidetes qui sont à Gram négatif et également anaérobies (45). On retrouve en plus petites proportions des Protéobactéries (Entérobactéries, Desulfovibrio, Akkermansia), des Actinobactéries (Bifidobactéries) et des Archebactéries (Méthanobrevibacter, Méthanogenesis). L'ensemble de ces micro-organismes et leurs gènes constituent le microbiome. Parmi ces bactéries seulement une très faible partie est cultivable.

B. Effets indésirables des antibiotiques sur la flore digestive commensale

L'action antibiotique sur la flore digestive peut-être recherchée, c'est le cas lors d'antibioprophylaxie dans le cadre de chirurgies digestives ou encore lors d'infections digestives (46), mais elle peut également être indésirable. C'est le cas lorsque la flore digestive commensale subit l'action antibiotique alors que la cible n'est pas dans le tractus digestif. La flore peut alors être déséquilibrée avec une réduction de la diversité des espèces bactériennes, parfois une disparition d'espèces commensales et une prédominance d'espèces pathogènes (47). L'action des antibiotiques sur les bactéries digestives peut également mener à la sélection de bactéries résistantes qui seront ensuite déversées dans l'environnement.

1. Voies d'entrées des antibiotiques dans le tube digestif

Les antibiotiques ne sont pas distribués et excrétés de manière homogène dans la lumière du tube digestif. Leur présence résulte principalement de l'administration par voie orale, de leur possible excrétion par voie biliaire et/ou de leur diffusion passive à travers la muqueuse digestive.

Le passage par diffusion passive des antibiotiques dépend de leur concentration dans le sang, de leur lipophilie ainsi que de leurs liaisons aux protéines plasmatiques.

Il existe deux voies principales d'excrétion des antibiotiques : l'excrétion urinaire et l'excrétion biliaire, cette dernière est plus importante chez les composés lipophiles à savoir les tétracyclines, les macrolides et apparentés, les fluoroquinolones, et le métronidazole (48). Lors d'administration de tétracyclines, on retrouve une concentration biliaire dix à quinze fois supérieure à celles mesurées dans le sérum. De même, lors d'utilisation de macrolides, leur concentration biliaire peut être jusqu'à quarante fois plus élevée que leur concentration sérique et leur excrétion se fait sous forme active (49). Une excrétion biliaire faible est également possible pour les composés amphotères appartenant à la famille des β -lactamines tels que l'amoxicilline ou l'ampicilline mais aussi de manière plus importante pour certaines céphalosporines (parmi les plus utilisées : cefadroxil, cefamandole, cefoxitin, cefotaxime, ceftriaxone) (49).

L'utilisation d'antibiotique par voie orale expose la flore digestive de manière directe, les antibiotiques avec une faible biodisponibilité sont ceux retrouvés en plus fortes concentrations dans la lumière du tube digestif. Les fluoroquinolones, les sulfamides, les imidazolés, ainsi que les tétracyclines sont des composés ayant une excellente biodisponibilité par voie orale, mis à part les composés ayant une forte excrétion biliaire (cyclines et quinolones) (50), ils sont peu concentrés dans la lumière du tube digestif lors de leur prise orale. Les macrolides et les lincosamines sont des composés ayant une biodisponibilité orale moyenne (30-80%) et variable selon la prise alimentaire. La lincomycine par exemple a une faible biodisponibilité orale (30%) et celle-ci peut être réduite de 50% lorsque l'individu n'est pas à jeun, ainsi plus de 70% de la

molécule se retrouve directement en contact de la flore digestive commensale sans compter la fraction de la molécule qui a été absorbée et qui est excrétée par voie biliaire dans le tube digestif. Parmi les β -lactamines la biodisponibilité orale est variable, celles des céphalosporines orales (entre 85-90%) est meilleure que celle des pénicillines A (70% pour l'amoxicilline) elle-même meilleure que celle des pénicillines M (70% pour la cloxacilline, 41% pour l'oxacilline). Des réévaluations des voies d'administrations des antibiotiques sont régulièrement effectuées en France par l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) afin d'améliorer le schéma thérapeutique et réduire l'apparition de résistances. Une des actions a notamment mené à l'arrêt de l'AMM des spécialités contenant de l'oxacilline administrés par voie orale. En effet la très faible biodisponibilité orale de cette molécule exposait les individus l'utilisant à des concentrations sub-inhibitrices favorisant ainsi l'émergence de résistance parmi les bactéries pathogènes.

Des concentrations élevées d'antibiotiques peuvent atteindre la lumière du tube digestif mais seulement une partie reste sous forme active, en effet les antibiotiques peuvent se lier au contenu digestif ou encore être détruits par les conditions du milieu et ainsi devenir inactif.

2. Dysbioses

La flore commensale, en plus de faciliter l'absorption des nutriments, participe à la maturation du tube digestif et au développement du système immunitaire, elle constitue d'ailleurs elle-même une barrière aux bactéries pathogènes (51). En effet, le microbiote assure, grâce à de nombreux mécanismes (48) (compétition métabolique, systèmes antibactériens, stimulation des mécanismes de défense épithéliaux), une protection à l'invasion et à la colonisation du tube digestif par des micro-organismes pathogènes. Lors d'une exposition aux antibiotiques, un désordre de la flore commensale peut survenir se traduisant par une modification de la composition et de la quantité de celle-ci, la barrière qu'elle constitue est alors rompue et les risques de colonisation par des bactéries pathogènes comme *Clostridium difficile*, des *Escherichia coli* pathogènes ou *Enterococcus faecium* augmentent (52)(53), c'est ce qu'on appelle la dysbiose intestinale. Elle se traduit généralement par une diarrhée, des ballonnements, des

douleurs intestinales et gastriques, ce sont d'ailleurs les effets secondaires principaux des tétracyclines et des macrolides.

Les variations interindividuelles de la composition de la flore commensale auxquelles s'ajoutent des facteurs extérieurs tel que l'alimentation ou le stress rendent les études sur l'impact des antibiotiques compliquées puisque la flore initiale avant traitement n'est jamais exactement la même. Lors d'études cliniques, le suivi chez un même patient de l'évolution de la flore au cours du traitement permet de s'affranchir du souci de variabilité interindividuelle. En se basant sur ces études, on peut voir que lors d'antibiothérapie orale avec des macrolides et des macrolides apparentés, on observe des changements importants de la composition de la flore commensale pendant le traitement qui peuvent s'expliquer par leur mode d'excrétion qui est majoritairement biliaire. On observe une diminution forte du nombre d'entérocoques et d'entérobactéries lors de traitement par des macrolides tandis qu'il est augmenté lors de traitement par des lincosamines. Le nombre d'anaérobies diminue significativement avec les macrolides et les lincosamines avec notamment les clostridies, les lactobacilles et les *Bacteroides* qui deviennent indétectables (52). On observe également lors de traitement avec la clindamycine et l'érythromycine une colonisation par *C. difficile* suite à la perturbation de la flore anaérobie (54). L'utilisation d'amoxicilline orale conduit lui à une augmentation significative de *Bacteroides*, d'entérobactéries et de bacilles à Gram positif dans le tube digestif. On observe également une colonisation par *Candida albicans* (52) chez certains individus. Lors de traitements oraux ou par voies parentérales avec des céphalosporines, on observe une augmentation des entérocoques et une diminution forte en entérobactéries (supérieure à $4\log_{10}$ UFC/g de fèces). La colonisation par *C. difficile* est également très fréquente. Une diminution forte des bacilles à Gram négatif aérobies du tube digestif associée à une diminution modérée des entérocoques est également observée lors d'antibiothérapie avec des quinolones. L'utilisation de tétracyclines mène à une élévation du nombre de *Bacteroides* qui augmente lorsque la dose administrée de tétracyclines augmente (55). Toutefois de manière générale, les études sur l'effet des tétracyclines ont montré que les modifications du microbiote étaient principalement qualitatives (augmentation de gènes de résistances parmi les bactéries présentes) plutôt

que quantitatives (modification de la proportion des espèces de la flore commensale) (56).

Malgré les perturbations de la flore liées aux traitements antibiotiques, la fonction digestive n'est que peu modifiée et elle est considérée comme « normale » pour la majorité des individus ayant fait l'objet du traitement (57). Après traitement antibiotique il y a, dans la majorité des cas, un retour à la composition initiale la flore bactérienne commensale dans les quatre semaines après la fin du traitement. Ce retour à la normale peut prendre jusqu'à six mois pour certaines espèces bactériennes (57). Toutefois ces perturbations peuvent dans certains cas persister au-delà de six mois après traitement. Il a par exemple été démontré que l'antibiothérapie avec de la clindamycine pouvait induire des perturbations sur les *Bacteroides* pouvant persister jusqu'à deux ans après le traitement (54). Un impact à long-terme a également été mis en évidence lors d'antibiothérapie avec de l'amoxicilline et de la cefpodoxime administrées par voie orale (48).

Ces modifications quantitatives de la flore commensale peuvent se traduire cliniquement par de la diarrhée, elles apparaissent chez 5 à 35 % des individus faisant l'objet d'un traitement antibiotique. Toutefois ces modifications quantitatives s'accompagnent également de modifications génomiques avec une émergence et une sélection de gènes de résistances dans la flore digestive.

3. Résistances

Lors d'une antibiothérapie, lorsqu'une partie de l'antibiotique passe dans la lumière intestinale, une pression de sélection s'applique sur les bactéries commensales intestinales. Or, les bactéries commensales qui sont très nombreuses constituent un réservoir de gènes de résistances. Plusieurs études ont montré la présence de bactéries commensales résistantes chez des enfants n'ayant jamais utilisé d'antibiotiques, des adultes vivants dans des villages éloignés et étant peu en contact avec les antibiotiques ou encore des adultes en bonne santé n'ayant jamais utilisé d'antibiotiques (58). Les gènes de résistances prédominants parmi ceux présents dans le résistome de la flore commensale intestinale sont ceux conférant une résistance aux tétracyclines, aux

macrolides et aux β -lactamines (53). Ces gènes sont principalement portés par *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, et *Escherichia spp.*(58) En présence d'antibiotiques, les bactéries porteuses de gènes de résistances peuvent être sélectionnées et se multiplier. La résistance peut aussi se disséminer par transfert de gènes de résistances qui a lieu majoritairement par conjugaison en ce qui concerne les gènes codant pour les β -lactamases. De plus, comme vu précédemment, les antibiotiques perturbent la flore commensale ce qui facilite la colonisation du tube digestif par des bactéries pathogènes qui sont elles-mêmes susceptibles de devenir résistantes par acquisition de gènes de résistance. Une étude a notamment montré que le risque de colonisation de l'intestin de souris par des entérocoques résistants à la vancomycine était augmenté lorsqu'elles recevaient un traitement antibiotique (59).

A l'arrêt du traitement antibiotique, la pression de sélection disparaît, les souches résistantes présentent alors une fitness plus faible que les autres souches mais des mutations compensatoires peuvent apparaître permettant ainsi de maintenir la compétitivité de ces souches. Ainsi les souches résistantes peuvent subsister dans le tube digestif même après la fin du traitement. Plusieurs études ont montré le maintien de souches résistantes aux macrolides jusqu'à deux ans après la fin du traitement à la clindamycine ou jusqu'à quatre ans après traitement à la clarithromycine. Une étude a également montrée le maintien de souches résistantes à l'ampicilline jusqu'à un an après la fin du traitement (60). Un traitement antibiotique peut donc mener au portage de bactéries résistantes par un individu même plusieurs années après son arrêt et conduire à la dispersion de ces bactéries dans l'environnement. Les bactéries commensales résistantes peuvent ensuite être transmises entre individus ou entre l'homme et l'animal par contact ou par l'environnement

IV. Description de l'association de molécules et objectif de

l'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet CO-ACTION qui est l'un des quatre-vingt-dix-neuf projets financés par la Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance (JPIAMR). Ce projet vise à développer de nouvelles combinaisons de molécules afin de faire face aux échecs thérapeutiques auxquels sont confrontés les professionnels de la santé lors d'infection par des bactéries multi-résistantes. Une des pistes de travail est de ré-évaluer l'intérêt d'antibiotiques négligés ou abandonnés de six différentes classes (dont la polymyxine B) dans le traitement des infections multi-résistantes. Dans ce projet, des combinaisons d'antibiotiques « anciens » avec des antibiotiques couramment utilisés et des molécules non antibiotiques ont été évaluées. Un grand nombre de combinaisons ont été testées in vitro sur des isolats bactériens résistants, les combinaisons les plus prometteuses ont ensuite été sélectionnées et testées in vivo sur des modèles animaux où la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de l'association étaient étudiées. L'émergence de bactéries résistantes à ces molécules en cours de traitement a également été recherchée en évaluant leur impact sur le microbiote intestinal, c'est sur cette partie que porte notre étude.

A. Préalable

1. Bactéries ciblées et choix de la thérapie combinée

Face au manque de traitements efficaces lors d'infection par des BMR, ce programme cible des BMR à Gram-négatif affectant les voies respiratoires telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii*. Ce sont des bactéries opportunistes responsables d'infections nosocomiales associées à un taux de mortalité élevé, il peut aller jusqu'à 50 % lors d'infection pulmonaires causées par

P.aeruginosa (61) et jusqu'à 69% lors de septicémies causées par *K. pneumoniae* (62). Elles sont connues pour être résistantes à un large panel d'antibiotiques dont les carbapénèmes et sont classées par l'OMS dans le groupe le plus critique des agents pathogènes prioritaires contre lesquels il est urgent de développer de nouveaux antibiotiques.

Lors d'infection par ces bactéries, la prescription de combinaison d'antibiotiques est préconisée pour les patients en état critique. En effet, la thérapie combinée permet d'élargir le spectre antibactérien ce qui augmente la probabilité d'avoir une activité contre la bactérie (63). Lorsque l'association est synergique, elle permet aussi d'augmenter l'activité antibactérienne (64). Certaines études ont également montré que l'utilisation de combinaisons d'antibiotiques empêchait ou retardait l'émergence de résistance au niveau du site infectieux, en effet la probabilité de la présence de mutants résistants aux deux antimicrobiens à la fois est plus faible que celle de la présence de mutants résistants à un seul antibiotique (à condition que les mécanismes de résistances soient distincts) (65). De plus l'effet synergique peut augmenter l'efficacité du traitement et permettre de réduire la taille de l'inoculum bactérien plus rapidement, ce qui réduit aussi la probabilité d'acquisition de résistances en cours de traitement (66). Toutefois, cet effet est à double tranchant ; une efficacité accrue entraîne une plus forte pression de sélection sur la population bactérienne pathogène et favorise le développement des mutants par rapport aux souches sauvages (67). La population de mutants croit alors plus rapidement et le traitement peut être le point de départ d'une multirésistance si ces mutants persistent.

Le recours à cette thérapie reste cependant indispensable chez les patients dont le pronostic vital est engagé, plusieurs études ont montré que ce traitement permettait d'augmenter les chances de survie. Une étude clinique a montré que les individus en état critique infectés par *P. aeruginosa* avaient un taux de survie de 53% avec un traitement combinant plusieurs antibiotiques contre seulement 8% avec une monothérapie (61). Le taux de survie est également plus élevé chez les patients en état critique atteint par *K. pneumoniae* ayant reçu une thérapie combinée.

2. Développement de combinaisons de molécules CO-ACTION

Le projet CO-ACTION a été découpé en six workpackages dans le but de rechercher les associations de molécules les plus prometteuses. Au cours de la première étape, plusieurs combinaisons d'antibiotiques couramment utilisés avec des antibiotiques négligés/abandonnés ou avec des molécules non-antibiotiques ont été sélectionnées à partir d'essais en checkerboards évaluant l'efficacité antimicrobienne. Des souches de *P. aeruginosa* et de *K. pneumoniae* multi-résistantes ont été exposées aux combinaisons et seules les combinaisons les plus efficaces ont été sélectionnées. La deuxième étape consistait à mieux caractériser l'activité extracellulaire des combinaisons sélectionnées in vitro. Durant cette étape des courbes de bactéricidies avec des concentrations statiques ou fluctuantes d'antibiotiques ainsi que des séquençages génomiques destinés à détecter d'éventuelles émergences de résistance ont été réalisés. L'activité intracellulaire des combinaisons d'antibiotiques sur des cellules infectées par les bactéries a été étudiée in vitro au cours de la troisième étape. La quatrième étape comparait l'activité des combinaisons antibiotiques chez cinq modèles animaux différents. La pharmacocinétique des combinaisons de molécules dans différentes matrices organiques telles que le plasma, les fèces ou le liquide de lavage broncho-alvéolaire a été étudiée chez le rat. Les effets des combinaisons et la distribution des molécules dans les tissus au cours du temps ont été étudiés chez des souris et des rats neutropéniques avec des infections au niveau des cuisses ou des poumons. On s'est ensuite appuyé sur un modèle porcin pour d'étudier l'impact de la combinaison d'antibiotiques sur la sélection de résistance dans leur flore commensale, à l'aide de cultures bactériennes mais également par séquençage génomique, c'est sur ce dernier modèle que notre étude repose. La cinquième étape consistait à la mise en place d'un modèle pharmacocinétique et pharmacodynamique de la combinaison. La sixième et dernière étape repose sur la mise en place de simulations permettant de prédire l'efficacité du médicament sur les patients et de déterminer les doses et les schémas thérapeutiques optimums.

L'association de polymyxine B avec treize antibiotiques différents contre des souches de *K.pneumoniae* multirésistantes a été explorée (68). Parmi les combinaisons

les plus prometteuses, l'association polymyxine B/ minocycline a été sélectionnée. Un effet synergique a été observé lors de l'association de ces molécules où l'effet de la minocycline a été amplifié par l'ajout de polymyxine B (69).

3. Dose et voie d'administration

Cette association de molécules est destinée au traitement de patients en état critique, l'administration du médicament se fait donc par voie intraveineuse par le biais d'un cathéter. La dose de minocycline administrée par voie IV aux patients adultes dans le cadre du traitement d'une infection causée par un pathogène multi résistant est de 200mg/j le premier jour soit pour un homme de 70kg environ 3mg/kg, puis 100mg toutes les 12h (70). Concernant la polymyxine B une dose de charge de 2 à 2,5 mg/kg IV est recommandée le premier jour du traitement suivie une d'administration de 1,25mg/kg toutes les 12h (71).

B. Propriétés des deux antibiotiques utilisés : la minocycline et la polymyxine B

1. Minocycline

La minocycline est un antibiotique appartenant à la famille des tétracyclines de deuxième génération, elle a été mise sur le marché pour la première fois en 1972 en tant que traitement des lésions causées par l'acné vulgaris (72). Elle est aujourd'hui indiquée dans le traitement de certaines infections dont les germes sont sensibles et lorsqu'aucun autre antibiotique n'est approprié.

a. Mode d'action et structure chimique

Les tétracyclines sont des inhibiteurs de la synthèse protéique qui ont une activité bactériostatique. La minocycline, dont la structure chimique est représentée sur la Figure 1, est une molécule lipophile. Elle entre dans la cellule bactérienne par diffusion passive à travers la bicouche lipidique puis traverse la membrane cytoplasmique par transport

actif, elle se fixe ensuite sur la sous unité 30S des ribosomes empêchant ainsi la fixation de l'amino-acyl-ARNt stoppant ainsi la phase d'élongation de la synthèse protéique, la phase de traduction est alors stoppée (73).

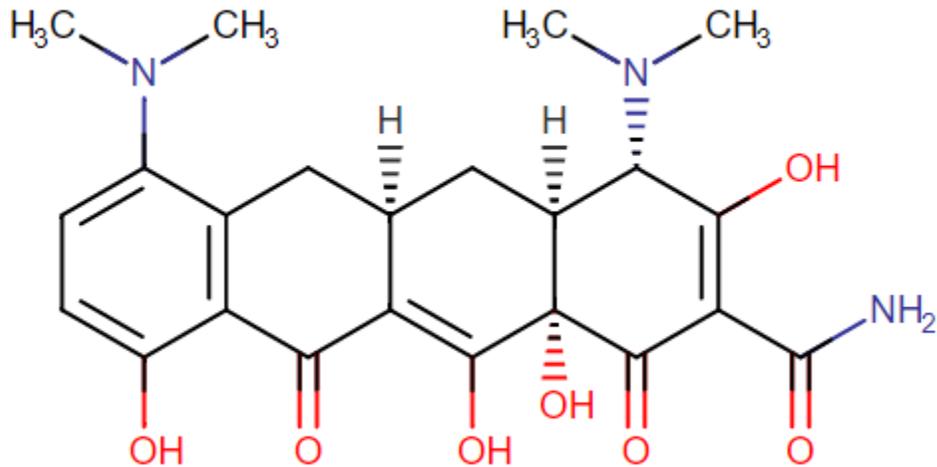


Figure 1 : Représentation de la structure chimique de la minocycline

La minocycline est un analogue de la tétracycline avec un groupe diméthylamine en position 7 et sans les groupes méthyle et hydroxyle en position 5. Ces particularités lui confèrent une meilleure liposolubilité ce qui rend sa diffusion tissulaire et cellulaire et son temps de demi-vie plus élevés que ceux de la tétracycline (70). Du fait de sa lipophilie, la minocycline est majoritairement éliminée par voie biliaire, 20 à 35% d'une dose de minocycline administrée par voie orale est retrouvée dans les fèces, 8 à 12% dans les urines et le reste est éliminé sous forme de métabolites (74).

b. Spectre d'activité

La minocycline est un antibiotique à large spectre agissant sur des bactéries aérobies et anaérobies, à Gram positif et négatif ainsi que sur les bactéries intracellulaires du genre *Chlamydia* spp. *Rickettsia* spp, et *Mycoplasma pneumoniae*.

c. Effets indésirables

Parmi les effets secondaires, les troubles vestibulaires (étourdissements, pertes d'équilibres) sont retrouvés le plus fréquemment lors de prise de minocycline orale. L'utilisation prolongée de ce médicament (comme c'était le cas pour le traitement de l'acné) est associée à l'apparition de lupus érythémateux disséminé (75) et d'hépatite auto-immune d'origine médicamenteuse dans de rares cas.

d. Mécanismes de résistances aux tétracyclines

Les tétracyclines sont des molécules antibiotiques apparues sur le marché dans les années cinquante (4). Leur spectre large et leur faible coût leur a valu d'être largement utilisées pour des infections variées. Dès la fin des années soixante, la première bactérie résistante aux tétracyclines *Shigella dysenteriae* a été isolée. Suite à l'augmentation de variants résistants, l'utilisation des tétracyclines a légèrement décliné (76). Les mécanismes de résistances aux tétracyclines sont variés et sont induits par de nombreux gènes de résistance, près de trente-huit ont déjà été identifiés (4). On peut les classer en trois groupes principaux, les gènes codant pour une pompe à efflux, les gènes codant pour une protéine protégeant la sous-unité ribosomique 30S et les gènes codant pour une enzyme inactivant les tétracyclines. D'autres mécanismes existent.

Les pompes permettent d'expulser les tétracyclines vers l'extérieur de la cellule par transport actif (50) empêchant ainsi leur accumulation dans la bactérie. Près de vingt-six gènes codent pour ce mécanisme, on les retrouve aussi bien chez les bactéries à Gram positif que chez celles à Gram négatifs (37). Ils sont localisés sur des éléments génétiques mobiles comme c'est le cas pour les gènes tet (A,B,C,D,G,H,Y,Z,31,33,39) qui se situent au niveau d'un plasmide ou d'un transposon mais ils peuvent également se situer au niveau du chromosome bactérien. La plupart des pompes à efflux codées par ces gènes confèrent une résistance à la tétracycline et à la doxycycline mais pas toujours à la minocycline et à la tigécycline (73). En effet, seules les bactéries exprimant

le gène tet(B) sont résistantes à la minocycline mais pas aux glycylicyclines. La tigécycline reste cependant sensible à l'efflux par des pompes à large spectre d'antibiotiques tel que MexXY-OprM qui confère également une résistance aux aminosides, au chloramphénicol et aux macrolides aux bactéries la possédant (77).

Avec le mécanisme des pompes à efflux, le mécanisme de protection du ribosome est l'un des plus répandus. Parmi les onze différents gènes codant pour une protéine de protection, les gènes tet(M) et tet(O) sont les plus répandus, ils ont été détectés respectivement dans vingt-quatre et huit genres bactériens différents. La protéine qu'ils codent s'apparente à une GTPase qui se lie au ribosome et brise la liaison tétracycline-ribosome lorsqu'elle hydrolyse le GTP (76). Ce mécanisme confère une résistance aux tétracyclines de 1^{ère} génération (tétracycline, oxytétracycline, chlortétracycline, 6-déméthylchlortétracycline) et de 2^{ème} génération (doxycycline et minocycline) mais pas aux tétracyclines de troisième génération (tigécycline) qui ont une meilleure affinité avec le ribosome (77).

Le troisième mécanisme est le moins répandu, il correspond à l'inactivation enzymatique des tétracyclines. Seuls trois gènes ont été identifiés dont le gène tet(X) qui code une enzyme hydroxylant les tétracyclines en présence d'oxygène, la tigécycline y compris. Il est localisé sur deux transposons qui portent également un gène de résistance à l'érythromycine (73).

2. Polymyxine B

La polymyxine B est un antibiotique de la famille des polypeptides tout comme la colistine, elle a été découverte au cours des années quarante (78) puis utilisée des années cinquante aux années quatre-vingt. Elle a ensuite été délaissée pour revenir peu à peu sur le marché au début des années deux mille suite à l'émergence de bactéries multi-résistantes (79). Elle peut être utilisée par voie parentérale ou sous formes locales (instillations auriculaires, oculaires, ovules vaginaux, pommades) et endosse aujourd'hui un rôle de thérapie de sauvetage lors d'infection à bactéries à Gram négatif multi-

résistantes (80).

a) Mode d'action et structure chimique

La polymyxine B agit sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif, elle a des propriétés bactéricides et elle est souvent utilisée en association avec d'autres antibiotiques. La molécule de polymyxine B se compose d'une chaîne cyclique et d'une chaîne linéaire en partie lipophile (Figure 2). Les groupements amines chargés positivement et portés par la partie cyclique de la polymyxine B interagissent avec les groupements phosphates des lipides A qui sont eux chargés négativement. Des liaisons électrostatiques sont alors formées entre les lipides A qui composent les lipopolysaccharides (LPS) et la polymyxine B. La partie lipophile de la polymyxine B s'insère ensuite dans la membrane externe ce qui déstabilise les LPS, la perméabilité membranaire est alors augmentée et il s'en suit une lyse bactérienne (78).

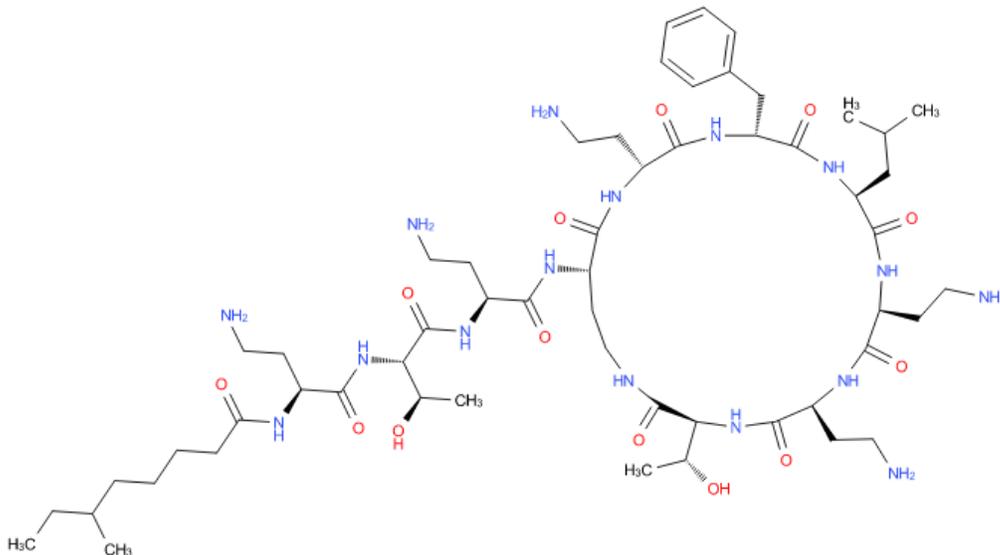


Figure 2 : Structure chimique de la polymyxine B

b) Spectre d'activité

Les polymyxines agissent seulement sur les bacilles à Gram négatif dont les

Entérobactéries avec *Klebsiella spp* et *E. coli*. Malgré la grand nombre de souches multi-résistantes parmi les bactéries à Gram négatif, la polymyxine reste active sur la majorité des isolats de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae* (81) et c'est l'un de ses intérêts principaux. Les bactéries à Gram positif sont naturellement résistantes aux polymyxines tout comme les bactéries anaérobies et les coques à Gram négatif (82).

c) Effets indésirables

La polymyxine B est caractérisée par une faible absorption orale et également par sa néphrotoxicité, elle a donc été longtemps réservée à des usages locaux via des topiques et des aérosols. Sa néphrotoxicité résulte de son action sur les membranes des cellules tubulaires rénales, elle augmente la perméabilité membranaire ce qui induit un appel d'ions et d'eau vers la cellule qui finit par se lyser (83). De plus, plusieurs études ont montré que lors de son excrétion, la polymyxine B persistait près de 48h dans les tissus rénaux avant d'être excrétée. Cette forte affinité pour les tissus rénaux pourrait avoir un lien avec sa néphrotoxicité (84).

d) Mécanismes de résistances aux polypeptides

La plupart des mécanismes de résistances bactériennes à la polymyxine B reposent sur la modification de leur capacité à se lier à la membrane externe des bactéries. La modification de la structure chimique du LPS est l'un des mécanismes les plus fréquemment retrouvés, chez les souches résistantes de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae*. Des groupements chargés positivement sont portés par le lipide A, l'ajout de charges positives sur les lipides A empêchent la formation de liaisons électrostatiques avec la polymyxine B elle aussi chargés positivement (81). Ce sont les gènes *pmrA* et *pmrB* ainsi que *phoP* et *phoQ* qui régulent les modifications structurales du lipide A (79). Leur expression agit sur les promoteurs d'autres gènes qui vont coder pour des protéines qui provoquent la déacylation du lipide A, sa phosphorylation ou encore l'ajout de chaînes 4-amine-4-deoxy-L-arabinose dessus, cette dernière modification étant la plus fréquente. Quelques études ont également montré l'implication

de pompes à efflux dans la résistance bactérienne aux polymyxines notamment avec celles codées par le gène *acrB* retrouvé chez des souches de *K. pneumoniae* et *E. coli* résistantes (81)(82).

C. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact d'administrations de polymyxine B et de minocycline par voie intraveineuse une fois par jour pendant cinq jours sur la sélection et la dissémination de la résistance dans la flore digestive du porc, une espèce modèle pour l'homme. Deux doses différentes de minocycline ont été administrées (une dose forte et une dose faible) à deux groupes de porcs pour mimer l'exposition plasmatique chez l'Homme, un groupe témoin ne recevait pas d'antibiotique. Afin de déterminer l'émergence ou la sélection de la résistance dans la flore digestive, des souches d'entérobactéries étaient isolées dans les fèces de porcs avant, pendant et après la période de traitement. Deux milieux d'ensemencements différents ont été utilisés, l'un permettant la croissance de toutes les entérobactéries et l'autre permettant uniquement la croissance d'entérobactéries résistantes. On a ainsi pu déterminer le nombre d'entérobactéries en UFC/g de fèces et la proportion d'entérobactéries résistantes à la minocycline avant, pendant et après le traitement antibiotique.

L'étude a eu lieu à l'ENVT dans l'unité mixte de recherche InTheres (Innovations Thérapeutiques et Résistances) qui est une unité pluridisciplinaire dont les recherches en antibiothérapie sont axées sur :

- L'optimisation des posologies des anti-infectieux chez l'Homme afin de réduire leur usage en se basant sur des études pharmacocinétiques et des modélisations pharmacologiques. Des études visant à réduire et optimiser leur utilisation chez les animaux d'élevage sont également menées.
- L'impact des traitements antibiotiques sur le microbiote intestinal.

C'est dans ce dernier axe de recherches que s'inscrit notre étude.

L'étude a débutée en avril 2019 dans le cadre d'un projet international financé par la

Joint Program Initiative on Antimicrobial Resistance. Les manipulations ont fait suite à une expérience pilote (phase 1), elles ont ensuite été découpées en deux phases (phase 2 et 3) durant lesquelles exactement le même protocole a été suivi. Seuls les animaux et la période de l'année ont varié lors de ces deux phases.

V. Matériel et méthodes

A. Protocole

1. Plan expérimental

L'expérimentation s'est déroulée en trois phases, la première étant la phase pilote, avec à chaque fois douze porcs d'environ 35 jours. Ces porcelets provenaient du Gaec de Calvignac 82300 St Vincent et pesaient environ 12kg à leur arrivée. Ils n'avaient jamais reçu de traitements antibiotiques et étaient déjà sevrés. A leur arrivée, les porcs ont été placés dans des boîtes individuelles, une acclimatation de quatre jours avant le début de la manipulation a été respectée. Ils ont été nourris et abreuvés à volonté avec des nourrisseurs individuels et ont été euthanasiés à la fin de l'expérimentation.

La minocycline a été administrée par voie intraveineuse pendant cinq jours consécutifs (de J1 à J5) par le biais d'un cathéter inséré dans la veine jugulaire. Les porcs ont été séparés en trois lots de quatre porcs chacun, un groupe témoin ne recevant pas d'antibiotique, un groupe « Low Dose » ou LD recevant une dose faible de minocycline fixée à 8mg/kg et enfin un groupe « High Dose » ou HD recevant une forte dose de minocycline fixée à 16mg/kg. Lors de l'expérience pilote, les lots LD et HD recevaient, en même temps que la minocycline, de la polymyxine à 3mg/kg par voie intraveineuse. La polymyxine n'a été administrée que lors de cette phase pilote, lors des phases 2 et 3 seule la minocycline était administrée du fait de la faible élimination de la polymyxine B par voie biliaire. Une manipulation préalable a permis de s'assurer que l'exposition à la

minocycline était la même avec et sans administration de polymyxine B.

2. Modalités d'analyses microbiologiques des échantillons

a) Choix du milieu d'ensemencement

Le milieu Mac Conkey est un milieu sélectif et différentiel qui permet l'isolement d'espèces bactériennes bacillaires à Gram négatif non exigeantes, à savoir les espèces appartenant à l'ordre des *Enterobacterales* et du genre *Pseudomonas*. Ce milieu contient du cristal violet qui inhibe le développement des coques à Gram positif et des sels biliaires qui inhibent les bactéries non entériques. Les colonies de bactéries qui fermentent le lactose telles qu'*E. coli*, *Enterobacter spp.*, et *Klebsiella spp.* apparaissent rose à rouge vif. Les bactéries qui ne fermentent pas le lactose apparaissent incolores (Tableau 2).

Tableau 2 : Bactéries dont la croissance est permise sur gélose Mac Conkey

Organismes	Croissance	Couleur de la colonie
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+++	Rose à rouge
<i>Escherichia coli</i>	+++	Rose à rouge
<i>Proteus vulgaris</i>	+++	incolore
<i>Salmonella enteritidis</i>	+++	incolore
<i>Salmonella typhi</i>	+++	incolore
<i>Shigella flexneri</i>	+++	incolore
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+++	
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Incolore à rose

Source : Fiche technique Mac Conkey Millipore®

Ce milieu sélectif des entérobactéries a été choisi car ce sont des bactéries sentinelles du développement de résistances. En effet le système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (GLASS) a désigné, lors de prélèvements de type

fécaux, des entérobactéries et notamment *Shigella spp* et *Salmonella spp.* comme agents pathogènes prioritaires pour la surveillance (85). Concernant les agents commensaux, l'OMS a également désigné *E. coli* et *Enterococcus spp.* en tant qu'organismes indicateurs d'antibiorésistance (86), leur niveau de sensibilité rend compte de la pression de sélection appliquée par les antibiotiques. *E. coli* est une bactérie de grand intérêt, elle fait partie des programmes de surveillance à la fois humain et animal et elle est également utilisée en tant qu'indicateur environnemental de pollutions fécales.

b) Choix de la concentration en minocycline

La concentration en minocycline dans les milieux de culture Mac Conkey supplémentés en minocycline a été sélectionnée afin que seules les souches résistantes puissent s'y développer. Pour déterminer une telle concentration, nous nous sommes appuyés sur la bibliographie et notamment des ECOFFs (epidemiological cut-off) fournies par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Les ECOFFs sont déterminés à partir d'études épidémiologiques regroupant un grand nombre de données de CMI provenant d'études internationales et de programmes de surveillances. Les souches bactériennes ayant une CMI inférieure à l'ECOFF sont dites sauvages : ce sont des organismes dépourvus de résistances acquises phénotypiquement détectables.

Les données fournies par l'EUCAST (Tableau 3) permettent de conclure que les souches sauvages d'*E. coli* ne se développent plus à des concentrations supérieures à 4mg/L de minocycline. Pour *Klebsiella spp.* et *Enterobacter cloacae*, la valeur de l'ECOFF est plus élevée avec respectivement 8 et de 16 mg/L. Ainsi en choisissant une concentration en minocycline supérieure ou égale à 8mg/L on s'assure que seules les souches d'*E. coli* et de *Klebsiella spp.* non sauvages peuvent s'y développer. Par contre, les souches d'*Enterobacter spp.* sauvages (et non sauvages) pourront toujours se développer. A cette concentration, la probabilité que des souches sauvages se développent reste élevée.

Tableau 3 : ECOFFs et TECOFFs⁴ pour la minocycline de bactéries appartenant à la flore commensale digestive

Organismes	(T)ECOFF (mg/L)
<i>Enterobacter cloacae</i>	16
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Klebsiella spp.</i> ((sauf <i>K. aerogenes</i>))	8 ((16))
<i>Enterococcus faecalis</i>	(0,5)

A la concentration de 16mg/L en minocycline, on s'assure donc que les souches qui s'y développent sont des souches non sauvages résistantes, c'est donc cette concentration en minocycline qui a été choisie dans les géloses Mac Conkey. Le risque d'utiliser une telle concentration est l'inhibition d'un grand nombre de souches bactériennes notamment de *E. coli* ayant acquis des gènes de résistance leur permettant de résister à 4 mg/mL mais pas à 16 mg/mL.

3. Modalités de collectes des échantillons et traitements immédiats

Des échantillons de fèces ont été prélevés tous les matins directement dans le rectum des porcelets. Les prélèvements ont débuté un jour avant le début du traitement antibiotique, puis ont été réalisés pendant toute la durée du traitement antibiotique ainsi qu'à J6, J7, J8, J10, J12, J15 et J18. Au total treize prélèvements de fèces ont été réalisés sur chaque porc, l'état général de l'animal, l'heure du prélèvement et la consistance des selles étaient à chaque fois notés. Afin de réaliser l'analyse microbiologique une dilution au 1/10^{ème} était réalisée : 2g de fèces étaient pesés et homogénéisés dans 18mL d'eau peptonée-30%glycérol à l'aide d'un bag-mixer®. Une partie de l'homogénat était réparti

⁴ Les TECOFFs sont basés sur 3 à 4 distributions tandis que les ECOFFs sont basés sur 5 à 100 distributions.

de façon égale dans deux aliquots de 3mL et stockés à -80°C , l'autre partie était diluée au $1/10^{\text{ème}}$ en ajoutant 900 μL de NaCl 0,9% à 100 μL d'homogénat. Des dilutions en série au $10^{\text{ème}}$ en plaque 96 puits étaient ensuite réalisées.

Une fois les dilutions réalisées, 5 μL de chaque dilution (de 10^{-1} à 10^{-8}) étaientensemencées en triplicat sur des géloses Mac Conkey avec cristal violet. Enfin deux géloses contenant de la minocycline étaientensemencées avec 500 μL d'homogénat à la dilution 10^{-1} . Les boîtes étaient ensuite placées à l'étuve à 35°C pendant 18 à 24 heures.

4. Modalités de comptage et de traitement des données

Les colonies ont été dénombrées et le nombre de bactéries par gramme de fèces a été calculé à partir des facteurs de dilution. Des remarques sur la couleur des colonies bactériennes mais également sur la qualité d'ensemencement étaient aussi ajoutées. Le nombre d'entérobactérales totales, le nombre d'entérobactérales résistantes (en UFC/g de fèces) et la proportion d'entérobactérales résistantes sont les données qui ont été enregistrées. L'utilisation de la proportion nous informe de la sélection de résistance, elle permet de savoir si la population sensible a été remplacée par une population bactérienne résistante. Les résultats ont ensuite été traités par le biais du logiciel R[®]. L'étude descriptive s'est appuyée sur les graphiques obtenus à l'aide de ce logiciel mais également à ceux obtenus grâce au logiciel Microsoft Excel[®].

Un modèle linéaire mixte statistique a été appliqué avec les porcs pour effet aléatoire et la dose, les jours, et la phase pour effets fixes. Nous avons également étudié l'interaction Dose:Jour en l'ajoutant comme effet fixe dans notre modèle. Ce modèle permet de prendre en compte les variabilités interindividuelles, chaque porc est indépendant et les valeurs recueillies chez un même porc sont corrélées entre elles. Il permet également de donner la part de variabilité entre chaque porc, un tel modèle est indispensable dans ce type d'études car il permet d'étudier les effets fixes tout en gommant les effets aléatoires que sont les porcs. Pour la modélisation, on a appliqué une méthode pas-à-pas descendante (backward stepwise selection) :

- On définit en premier lieu la structure des effets aléatoires en choisissant quels

paramètres sont les plus significatifs pour décrire cet effet

- Ensuite on travaille sur les effets fixes, on part d'un modèle qui contient toutes les variables considérées (Phase, Animaux, Dose, Dose:Jour) et on le compare, à l'aide d'un test de rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio Test = LRT), avec un modèle contenant une variable en moins (seulement Dose, Phase et Animaux par exemple). Si ces deux modèles ne sont pas significativement différents on choisit le modèle le plus simple et on continue jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de variables.

L'hypothèse H_0 est l'absence d'effet/ absence de différence et α le seuil de significativité est fixé à 0,05. Ainsi si $p\text{-value} < \alpha$, l'hypothèse H_0 est rejetée.

Après avoir modélisé on vérifie les hypothèses du modèle linéaire mixte, à savoir :

- L'homoscédasticité (caractéristique d'un modèle de régression linéaire qui implique que la variance des erreurs est constante dans le temps)
- La normalité des effets aléatoires
- La normalité des effets fixes

B. Choix du porc comme modèle d'étude

Afin de déterminer l'impact de l'association antibiotique sur la flore digestive humaine, le porc a été choisi comme modèle. Lors du choix du modèle d'étude plusieurs critères ont été pris en compte notamment la facilité de manipulation, le coût mais aussi la similarité de leur microbiote intestinal avec celui de l'espèce humaine.

1. Comparaison des tractus intestinaux et de leur composition

Le porc et l'Homme ont de nombreuses similarités anatomiques et physiologiques. Ce sont toutes deux des espèces monogastriques, omnivores avec des processus d'absorption et de digestion analogues ainsi que des temps de transit équivalents (87).

Des différences anatomiques sont notables au niveau de l'estomac, chez le porc la muqueuse œsophagienne occupe une partie plus importante que chez l'homme. Ces

particularités physiologiques sont à l'origine de différences importantes de la flore gastrique et rendent difficiles l'utilisation du porc comme modèle lorsque cette flore est concernée (88). Mis à part l'estomac, l'appareil digestif du porc est très similaire à celui de l'homme. Chez ces deux espèces, le côlon est le site principal de la fermentation contrairement aux rongeurs pour qui elle a principalement lieu dans le caecum, c'est également dans ce segment d'intestin qu'on retrouve la plus grande population de micro-organismes.

Les similarités de ces espèces ne sont pas seulement anatomiques, leurs flores bactériennes intestinales sont aussi très proches, comme pour l'homme les deux phyla de bactéries prédominantes sont les Firmicutes et Bacteroidetes suivi des Proteobactéries (85). On observe toutefois des différences dans les genres et espèces bactériens isolés, contrairement à l'homme c'est les genres *Prevotella spp.* et *Anaerobacter spp.* qui prédominent parmi les Bacteroidetes et les Firmicutes respectivement et non *Bacteroides spp.* et *Clostridium spp* (89).

2. Choix de la dose à administrer aux porcelets

Cette combinaison d'antibiotiques est destinée au traitement par voie intraveineuse de patients en réanimations. Chez l'homme, les doses de minocycline et de polymyxine B à administrer sont de 3mg/kg/j et de 2,5mg/kg/j respectivement (cf IV.A.3). Afin d'étudier leur impact sur le microbiote humain en utilisant le modèle du porc il était nécessaire d'obtenir une exposition du microbiote aux antibiotiques similaire chez le porc et chez l'homme. Pour cela une étude pharmacocinétique a été réalisée chez le porc, avec une administration d'une dose IV de 4 mg/kg de minocycline seule ou en combinaison avec la polymyxine B à 3mg/kg. Les concentrations plasmatiques en minocycline ont été suivies en fonction du temps. Afin d'obtenir la même exposition aux antibiotiques on souhaite obtenir la même aire sous la courbe (AUC) chez l'Homme et chez le porc.

La courbe représentée sur la Figure 3 a été obtenue chez le porc.

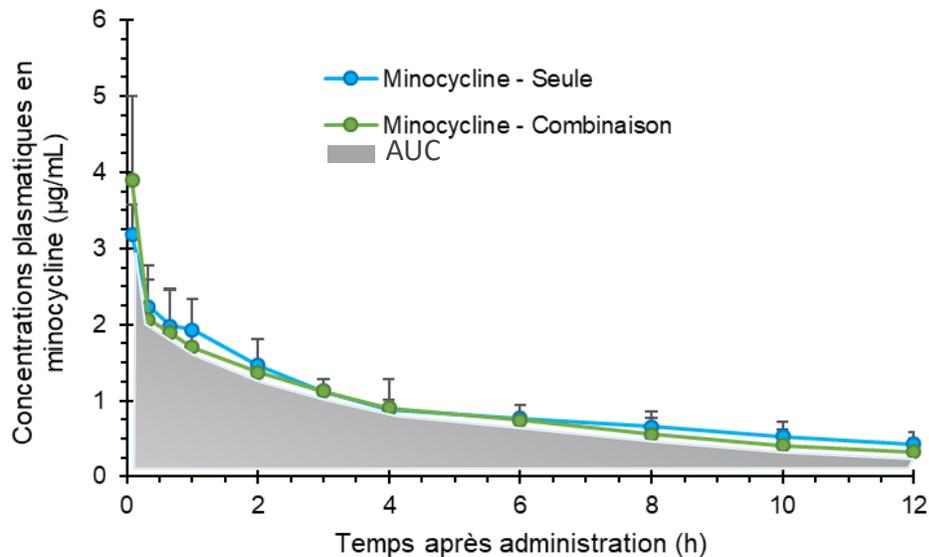


Figure 3 : Concentrations plasmatiques en minocycline en fonction du temps chez le porc

On observe que l'exposition (AUC) à la minocycline est identique lorsqu'elle est administrée seule ou en combinaison avec la polymyxine B. Ces résultats ont permis d'obtenir la clairance totale en L/h/kg chez le porc grâce à la formule suivante :

$$\text{Clairance totale} = \text{DOSE}(iv) / \text{AUC}(\text{plasma})$$

On a ainsi obtenu $Cl_{\text{tot, porc}} = 0,29 \text{ L/h/kg}$. Or d'après une étude, la clairance totale de la minocycline chez l'homme se situe dans l'intervalle $[3,4-5,7 \text{ L/h}]$ (74), soit $[0,048-0,081] \text{ L/h/kg}$ pour un homme de 70kg. La clairance totale du porc est donc 3,6 à 6 fois plus élevée que celle de l'homme. Afin d'obtenir la même AUC chez le porc il faut donc une

$$\text{Dose}(iv, \text{porc}) = \text{Clairance}(iv, \text{porc}) * \text{AUC}(\text{plasma}, \text{homme})$$

$$\begin{aligned} \text{Soit } \text{Dose}(iv, \text{porc}) &= 3,6 - 6 * \text{Clairance}(iv, \text{homme}) * \text{AUC}(\text{plasma}, \text{homme}) \\ &= 3,6 - 6 * \text{Dose}(iv, \text{homme}) \end{aligned}$$

Il faut donc administrer 3,6 à 6 fois la dose administrée chez l'homme, soit une dose de minocycline entre 10,8 et 18mg/kg. Les doses de 8mg/kg pour le groupe Low Dose (LD)

et de 16mg/kg pour le groupe High Dose (HD) ont été choisies, une dose plus élevée étant impossible à tester du fait de la précipitation de la minocycline dans le solvant d'administration au-delà de 16mg/kg.

VI. Résultats

A. Etude descriptive

Suite au dénombrement des bactéries, les données disponibles pour les analyses étaient donc :

- « Logtot » logarithme du nombre de bactéries totales dénombrées sur milieu sélectif d'*Entérobactérales*
- « LogMino » logarithme des bactéries dénombrées sur milieu de culture contenant de la minocycline sélectif de bactéries résistantes
- « LogPropor » logarithme de la proportion en bactéries résistantes, $\text{Log}\left(\frac{\text{Mino}}{\text{tot}}\right)$

et ce pour chaque porc numérotés de 1 à 8, chaque dose (LD, HD,T), pour chaque jour (allant de -1 à 18) et pour chaque phase (2 et 3).

Avant d'étudier les effets des différents facteurs, nous nous sommes appuyés sur une étude descriptive.

1. Evolution du nombre total de bactéries au cours de l'étude

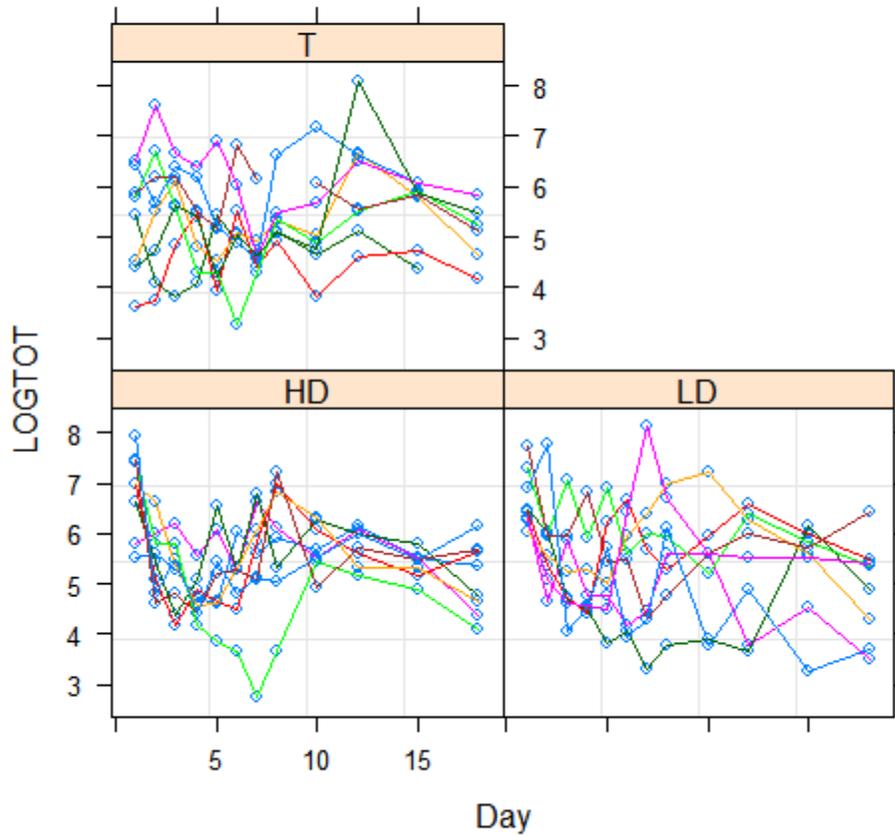


Figure 4 : Représentation des Logtot de tous les porcs des phases 2 et 3 en fonction des jours

La figure 4 représente les LogTot de chaque porc entre J1 et J18. De ces graphiques plusieurs tendances se dégagent, on observe que pour les individus dans le groupe témoin le nombre total d'*Enterobacterales* est compris entre 10^4 et 10^8 UFC/g pour tous les individus. Pour le groupe HD on observe une diminution du nombre total d'*Entérobacterales* durant les premiers jours, ce qui correspond aux jours traitement (J1

à J5) il y a ensuite une ré-augmentation et à nouveau des valeurs majoritairement comprises entre 10^4 et 10^8 UFC/g. Concernant le groupe LD, la diminution du nombre d'*Entérobactérales* est moins marquée que pour HD en début de traitement et la variabilité est élevée pour les jours suivants. Ces graphiques suggèrent donc que la dose administrée pourrait avoir un impact le nombre de bactéries totales notamment pour le groupe HD et qu'il existe également un facteur « jour » puisque cet impact est d'autant plus marqué au début du traitement. Suite à cette observation, nous avons choisi de faire une étude statistique avec les données des jours 1 à 18 mais également en se limitant aux données de J1 à J6. On se concentre alors sur la période traitement (J1 à J5) et post-traitement immédiat (J6). En effet d'après l'étude de Q.Valle (90) la concentration en minocycline dans les fèces est encore élevée (supérieure à la CMI des *Entérobactérales*) 24h après le dernier traitement qui a lieu à J5 et elle devient ensuite bien inférieure à la CMI 48h après le dernier traitement.

2. Evolution des proportions d'*Entérobactérales* résistantes à la minocycline au cours du traitement

La figure 5 est la représentation graphique de la proportion d'*Entérobactérales* résistantes à la minocycline en fonction des jours, dénombrées dans les fèces des trois groupes de porcs (T, LD et HD). $\text{LogPropor} = 0$ correspond au remplacement total de la population sauvage d'*Entérobactérales* par des souches résistantes. On observe qu'au cours du traitement et plus précisément entre J2 et J6, il y a une tendance à l'augmentation de la proportion d'*Entérobactérales* résistantes chez le groupe HD. La proportion d'*Entérobactérales* résistantes chez le groupe qui a reçu une forte dose est plus élevée que celle du groupe témoin et du groupe faible dose.

Ces résultats suggèrent donc qu'il existe un impact de la dose sur la proportion d'*Entérobactérales* résistantes même si la différence avec le groupe témoin reste faible et très variable.

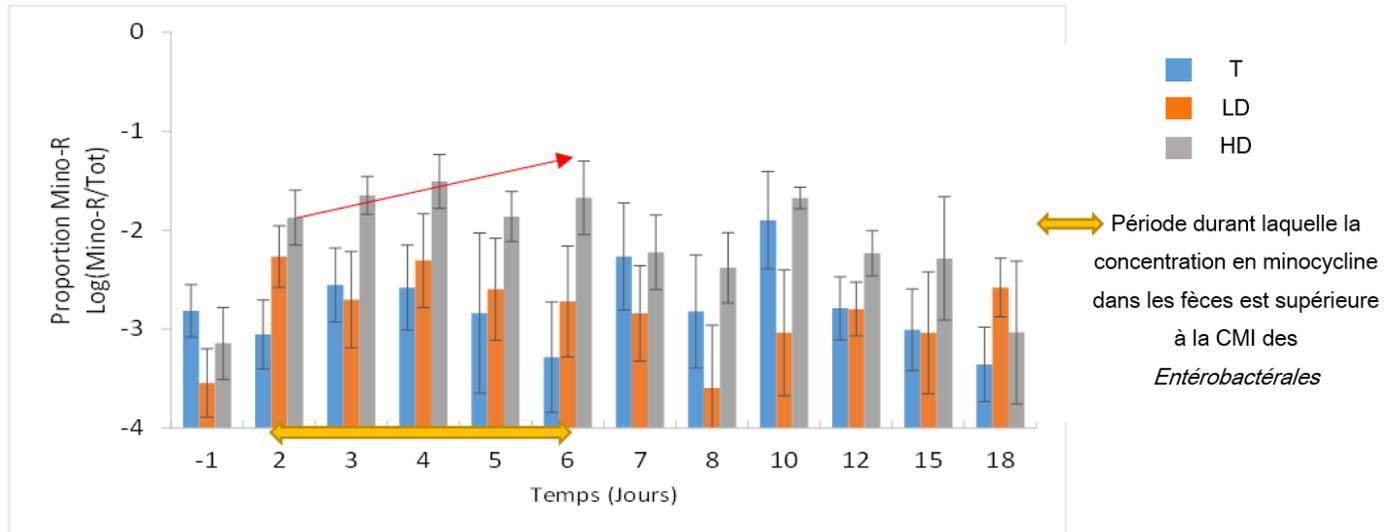


Figure 5 : Histogramme de LogPropor des trois groupes de porcs de la phase 2 et 3 en fonction des jours

3. Comparaison des différentes phases

Nous avons supposé au début de notre manipulation qu'il n'y avait pas de facteur phase. On s'attendait à ce que les données recueillies chez tous les porcs en fonction des jours, soient très proches. Pourtant lorsqu'on compare les courbes LogPropor ou LogMino des phases P2 et P3 (Figure 6) on observe des écarts importants. Les données LogMino de la phase P3 par exemple présente des données majoritairement réparties entre 2,5 et 4 log UFC/g tandis que LogMino de P2 présente des données plus variables comprises entre 0,5 et 4 log UFC/g. Cette observation suppose que retirer complètement le facteur phase peut être un biais dans notre étude statistique. Il sera donc gardé comme facteur pour la suite.

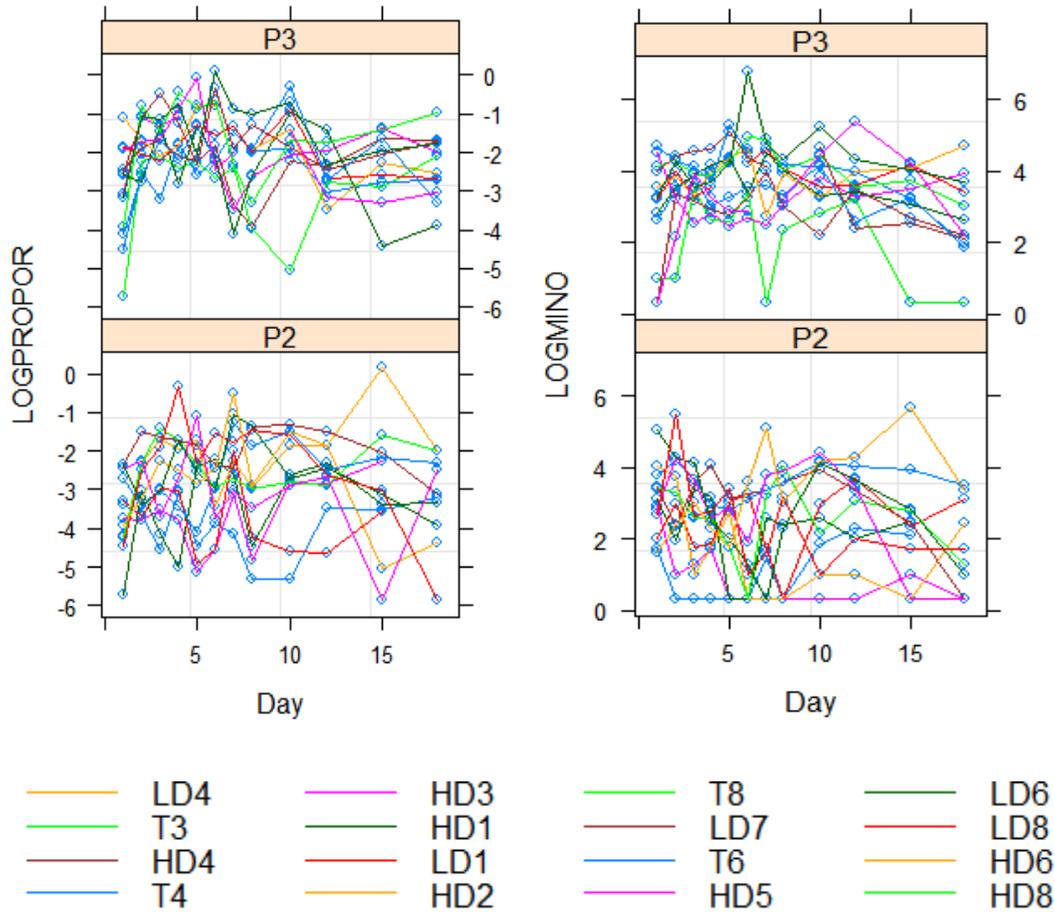


Figure 6 : Représentation graphique de LogPropor et LogMino, des phases P2 et P3, pour tous les porcs en fonction des jours

4. Evolution du nombre total pour chaque porc en fonction des jours

Le but de notre modélisation est de rechercher le modèle qui correspond le mieux à notre étude afin d'interpréter au mieux les valeurs des effets fixes mais aussi de pouvoir quantifier les effets observés.

La Figure 7 représente le nombre de bactéries chaque jour de la manipulation pour chaque individu. Les courbes noires représentent les régressions linéaires qui ont pour équation $y = ax + b$, avec x les jours, a le coefficient de corrélation et b l'intercept (ordonnée

à l'origine). On voit que pour chaque individu la pente (a) et l'intercept (b) sont très différents. Cette variabilité interindividuelle nous a mené à choisir les porcs comme effet

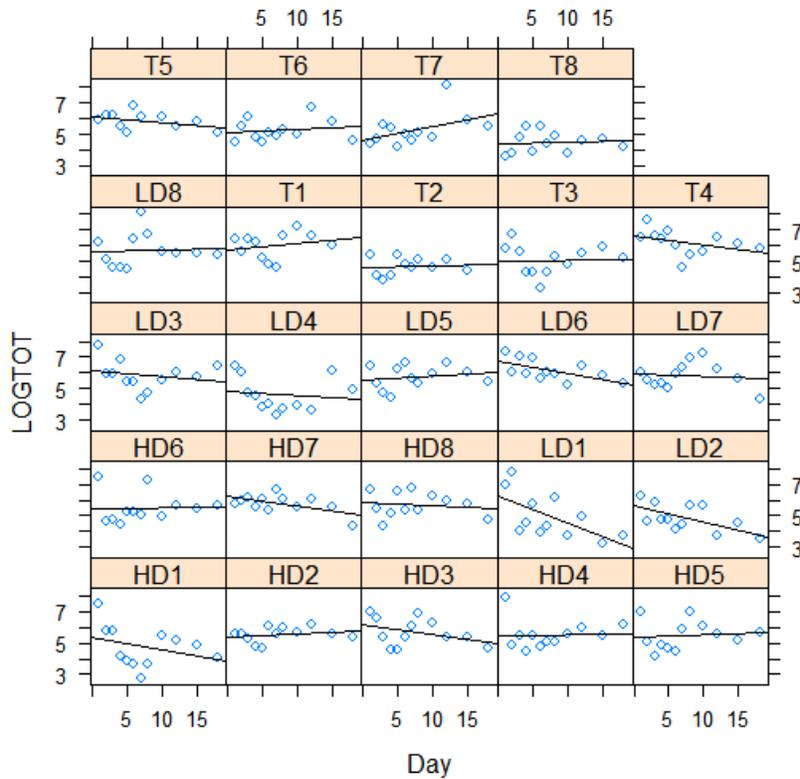


Figure 7 : LogTot de chaque individu en fonction des jours avec leurs courbes de régression linéaire (en noire)

aléatoire.

Les observations faites dans l'étude descriptive nous ont menées à choisir les jours, la dose, la phase et l'interaction dose : jour comme effets fixes. Elles nous ont également menées à effectuer une modélisation en prenant les données des jours 1 à 18 mais également jours 1 à 6.

B. Etude statistique des effets observés entre les jours 1 à 18

1. Etude statistique des nombres totaux de bactéries

Comme expliqué dans la partie matériel et méthodes, un modèle linéaire mixte a été utilisé avec les porcs pour effet aléatoires. Le modèle complet a d'abord été testé puis la méthode pas à pas descendante a été appliquée.

a) Structure des effets aléatoires

Les effets aléatoires sont définis par les intercept (b) et les coefficients de régression linéaire (a). On crée alors un modèle complet avec les effets aléatoires définis par intercept et pente puis on le compare au modèle ne considérant que l'intercept. On compare ensuite ces deux modèles, on a obtenu un p-value de 0,99 $>> \alpha$. Il n'y a donc pas de différence significative entre ces deux modèles, celui choisi est le plus simple, la structure des effets aléatoires restera donc sur l'intercept.

b) Structure des effets fixes

On crée un modèle complet avec les effets aléatoires structurés sur l'intercept et tous les effets fixes (les jours, la dose, la phase et l'interaction dose : jour). On crée un modèle sans l'effet « Phase » et on le compare au modèle complet. On obtient une p-value de 0,19. Ces deux modèles ne sont donc pas significativement différents, on peut donc retirer l'effet phase. Ainsi pour LogTot des jours 1 à 18, la phase n'a pas d'impact significatif sur le nombre total d'*Entérobactérales* des porcelets. En suivant la même méthode, on obtient que l'effet d'interaction Dose : Jour peut être retiré (p-value de 0,09) et que l'effet dose peut également être retiré (p-value de 0,85). Enfin on obtient que l'effet jour est significatif avec une p-value de 0,047, le jour de prélèvement a donc un impact sur le nombre total d'*Entérobactérales* des porcelets. Le modèle final est donc défini par les effets aléatoires structurés par l'intercept et les effets fixes avec seulement l'effet jour

retenu. Lorsque l'on quantifie cet impact avec la fonction « summary » de R on quantifie la diminution du LogTot à 0,02 tous les jours (Figure 8) avec un intervalle de confiance à 97,5 % de [-0,04 ; -0,0003]. Si cet effet jour existe réellement, il est extrêmement faible. Le modèle indique également qu'environ 20% de cet effet est dû à la variabilité interindividuelle des porcs après calcul de l'ICC (Coefficient de Corrélation Intraclasse) qui est égal à la variance des effets aléatoires divisée par la variance totale. En effet ici $l'ICC = 0,1841 / (0,1841 + 0,7495) = 19,7\%$.

```

Random effects:
  Groups   Name                Variance Std.Dev.
Animal    (Intercept)    0.1841  0.4291
Residual                      0.7495  0.8658
Number of obs: 285, groups: Animal, 24

Fixed effects:
              Estimate Std. Error t value
(Intercept)  5.58056    0.12736  43.818
Day          -0.02042    0.01025  -1.992

```

Figure 8 : Paramètres d'intérêt du modèle LogTot

On vérifie ensuite les hypothèses citées dans la partie matériel et méthode à savoir l'homoscédasticité, la normalité des effets aléatoires et la normalité des résidus. Parmi ces hypothèses, seule la normalité des résidus n'est pas respectée, en effet la p-value du test Shapiro-Wilk (qui est un test de normalité) est de 0,04. Toutefois le modèle linéaire mixte est un modèle robuste, même si on s'éloigne légèrement de la normalité les estimations restent très bonnes.

2. Etude statistique des nombres de bactéries résistantes

En suivant la même démarche que pour LogTot les variables fixes non significatives sont retirées les unes après les autres. Finalement on obtient un modèle avec les effets aléatoires seulement car aucun effet fixe n'a d'impact significatif. Rien ne ressort de ce modèle.

3. Etude statistique des proportions de bactéries résistantes

De la même manière un modèle LogPropor a été créé, les effets aléatoires sont structurés sur l'intercept. Concernant la structure des effets fixes, l'effet phase apparaît comme significatif (p-value de 0,05) et l'effet dose également (p-value de 0,02). Le reste des effets fixes n'apparaît pas comme significatif. Finalement le modèle comprend l'effet aléatoire défini par l'intercept, l'effet dose et l'effet phase.

Des différences dans la variation des proportions de bactéries résistantes sont détectées entre les groupes HD, T et LD mais également entre les phase 2 et 3. Afin de déterminer si ces différences sont significatives nous réalisons des tests de comparaisons multiples par la méthode de Bonferroni (Tableau 4).

Tableau 4 : Comparaison des facteurs Phase

	Estimation	P value
P2-P3	-0,83	0,0008

Les valeurs de LogPropor de la phase P2 sont significativement plus faibles que celles de la phase P3. On doit ajouter à chaque valeur de Logpropor de la deuxième phase 0,8 (avec un intervalle de confiance à 97,5% [0.44 ;1.22]) pour se rapprocher de la proportion en bactéries résistantes de la phase 3.

Nous avons ensuite comparé les facteurs dose deux à deux. Les résultats suivants sont obtenus :

Tableau 5 : Comparaison deux à deux des facteurs doses

	Estimation	P value
HD - LD	0,666	0,053
HD - T	0,563	0,1253
LD - T	-0,103	1,000

Finalement la p-value est toujours supérieure à 0,05, on estime donc qu'il n'y a pas de différences significatives de la proportion de bactéries résistantes chez les groupes HD,

T et LD.

Là encore d'après l'ICC la variabilité interindividuelle est estimée à 20% ce qui justifie bien l'utilisation d'un modèle mixte qui tient compte de cette variabilité.

C. Etude statistique des effets observés entre les jours 1 à 6

1. Etude statistique des nombres totaux de bactéries

a) Structuration des effets aléatoires

On crée un modèle complet avec tous les effets fixes et avec effets aléatoires sur intercept et pente. Ensuite on crée un modèle identique mais avec effets aléatoires seulement sur intercept. On compare ensuite ces deux modèles via le test de rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio Test = LRT), on n'obtient pas de différence significative, la structure de l'effet aléatoire reste donc sur l'intercept.

b) Structuration des effets fixes

Par la même méthode dite pas à pas descendante, on obtient que l'effet d'interaction Dose:Jour, l'effet Phase et l'effet Dose n'ont pas d'impact significatif sur les LogTot, ils ont donc été retirés du modèle. Seul l'effet aléatoire structuré sur l'intercept et l'effet jour sont donc retenus.

```
Random effects:
Groups   Name              Variance Std.Dev.
Animal  (Intercept)  0.1752  0.4186
Residual                0.6958  0.8341
Number of obs: 144, groups: Animal, 24

Fixed effects:
              Estimate Std. Error t value
(Intercept)    6.1688    0.1801  34.258
Day            -0.2102    0.0407  -5.164
```

Figure 9 : Paramètres d'intérêt du modèle LogTot de J1 à J6

Chaque jour le logarithme du nombre total de bactéries diminuaient de 0,2 au cours du traitement (Figure 9), cette valeur est comprise dans l'intervalle de confiance à 97,5% [-0,29 ; -0,13 log UFC/g]. De nouveau l'ICC est de 20%. Nous obtenons finalement le modèle représenté par la droite fuchsia sur la Figure 10.

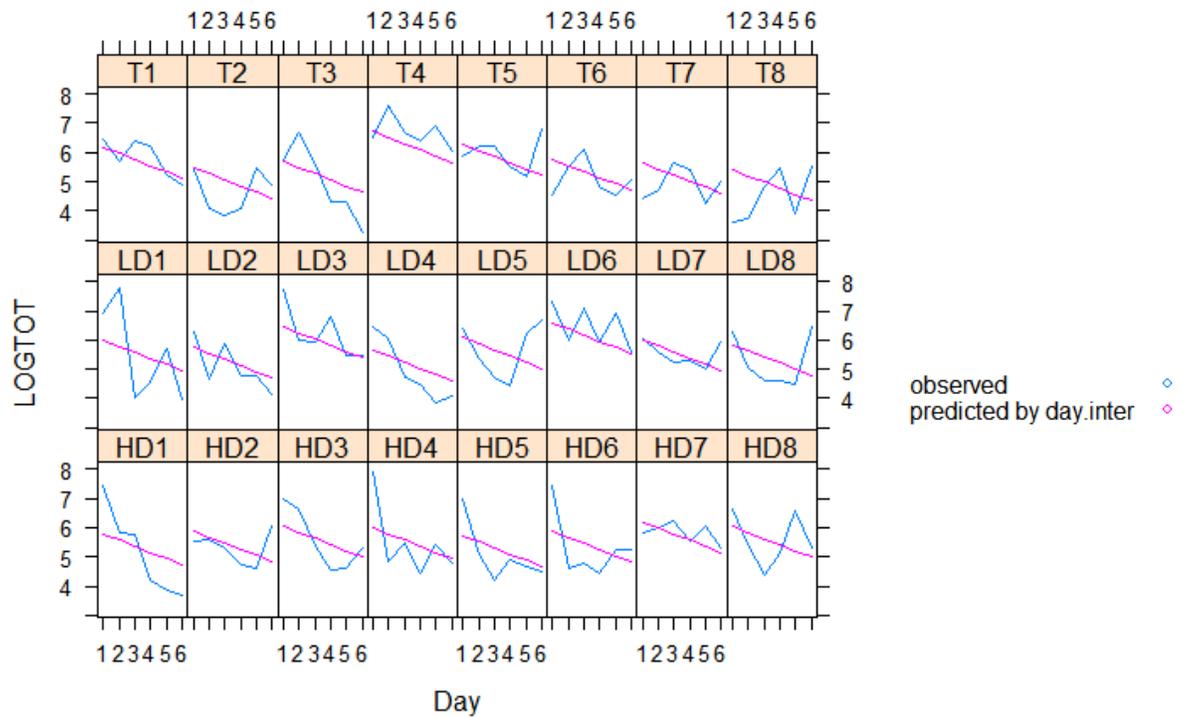


Figure 10 : Représentation graphique du modèle LogTot sur J1 à J6

L'homoscédasticité est respectée, la normalité des résidus et des effets aléatoires le sont également.

2. Etude statistique des nombres de bactéries résistantes

Lors de la modélisation de LogMino la structuration des effets aléatoires a été faite sur l'intercept et la pente, les deux ont été conservés. Ensuite tous les effets fixes ont été retirés car non significatif mis à part l'effet phase. Or garder un modèle avec pour seuls effets, les effets aléatoires et la phase pour effet fixe n'avait pas de sens biologique au vu de notre étude. Nous avons donc reproduit ce modèle sans l'effet phase, dans ce cas

à nouveau les effets fixes n'apparaissent pas comme significatifs. Ce modèle n'est alors régi que par les effets aléatoires, l'ICC calculé est de 70%.

3. Etude statistique des proportions de bactéries résistantes

a. Modélisation avec l'effet phase

La structure des effets aléatoires reste sur l'intercept. On structure ensuite les effets fixes, on crée un modèle sans l'effet phase qu'on compare au modèle complet. La p-value obtenue est très inférieure à 0.05, il y a donc une différence significative entre les deux modèles. La phase a un effet significatif sur LogPropor, son effet est donc maintenu dans le modèle. L'interaction Dose:Jour est retirée du modèle. L'effet dose est maintenu dans le modèle car une différence significative avec le modèle sans a été détectée (p-value de 0,0099). L'effet jour a également été conservé dans le modèle avec une p-value de 0,00045. Finalement la phase, la dose et les jours sont retenus dans le modèle comme étant des variables impactant significativement LogPropor.

b. Comparaison avec un modèle qui ne considère pas cet effet phase

Nous nous sommes ensuite intéressés au bien-fondé de la considération de l'effet phase, pour ce faire nous avons recréé un modèle LogPropor qui ne prend pas en compte l'effet phase. Nous avons ensuite à nouveau structuré les effets aléatoires et les effets fixes par la méthode pas à pas descendante. Un modèle avec une structure des effets aléatoires sur l'intercept et seulement les jours pour effet fixe a été retenu.

Nous avons ensuite comparé entre eux les deux modèles mixtes linéaires créés (l'un prenant en compte l'effet phase, l'autre non). Pour comparer ces deux modèles nous avons utilisés les coefficients d'informations à savoir l'AIC (Critère d'Informations d'Akaike) et le BIC (Critère d'Information de Bayes). L'intérêt de ces critères est qu'ils permettent de comparer n'importe quels modèles créés à partir de la même base de données. Plus leur valeur est faible, plus les données sont ajustées et meilleur est le modèle. Les AIC et BIC obtenus sont représentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : AIC et BIC des deux modèles créés

Modèle LogPropor	AIC	BIC
Sans le facteur phase	411,06	422,91
Avec le facteur phase	393,46	414,20

Ces deux paramètres sont plus faibles pour le modèle prenant en compte la phase. Le modèle avec l'effet Phase a donc un meilleur ajustement que celui sans, il est donc important de tenir compte de l'effet phase dans nos modèles.

Nous avons ensuite comparé les facteurs doses deux à deux (Tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison des groupes HD, LD et T deux à deux

	Estimation	P value
HD - LD	0,741547	0,0465
HD - T	0,742341	0,0458
LD - T	0,000794	1,000

D'après les résultats de modélisation il existe une différence significative entre les proportions de bactéries résistantes des groupes HD et LD, ainsi qu'entre les groupes HD et T. Notre modèle estime d'ailleurs cette différence de LogPropor à environ 0,74 avec [0,22 ; 1,26 log UFC/g] pour intervalle de confiance à 97,5%.

Les proportions de bactéries résistantes des groupes LD et T n'apparaissent pas dans notre modèle comme significativement différentes.

```

Fixed effects:
              Estimate Std. Error t value
(Intercept) -3.03547    0.27203  -11.159
Day          0.15104    0.04208   3.590
DoseLD      -0.74155    0.28027  -2.646
DoseT       -0.74234    0.27962  -2.655
PhaseP3     1.12080    0.22866   4.901
    
```

Figure 11 : Paramètres d'intérêt du modèle LogPropor de J1 à J6

Comme on peut le lire sur la Figure 11, tous les jours une augmentation du Logpropor de 0,15 chez le groupe HD, avec [0,07 ; 0,24 log UFC/g] pour intervalle de confiance à 97,5% est également estimé par notre modèle.

c. Vérification des hypothèses du modèle et représentation finale

L'homoscédasticité est respectée, la normalité des résidus aussi et la normalité des effets aléatoire également. Nous avons ainsi pu représenter le modèle final représenté par la droite fuchsia sur la Figure 12, en le superposant aux courbes réellement obtenu lors du comptage bactérien (courbe bleu).

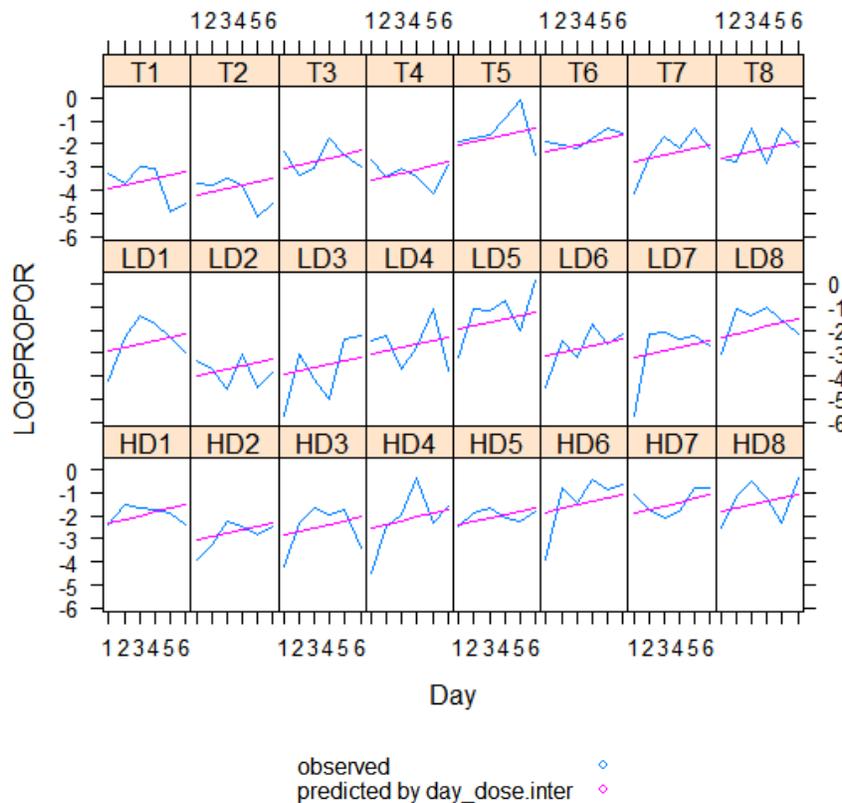


Figure 12 : Représentation finale du modèle LogPropor de J1 à J6

VII. Discussion

A. Effet de la minocycline sur les Entérobacterales fécales

1. Concentrations en minocycline dans le tractus digestif et hypothèses de départ

L'étude de l'impact de la minocycline sur l'émergence de résistance au niveau de la flore commensale s'est d'abord appuyée sur l'étude de l'exposition du microbiote intestinal à la minocycline. Afin de déterminer cette exposition, une étude a été menée préalablement à cette thèse dans l'unité INTHERES (90). Dans cette étude, une dose unique de 8 mg/kg de minocycline était administrée par voie intraveineuse à des porcelets âgés de 2 à 4 mois et pesant environ 12kg. Trois porcs étaient ensuite sacrifiés à chaque temps de prélèvement à savoir 1h, 4h, 7h, 24 et 48h post-injection. Du sang, de la bile, du contenu digestif des différents segments du tube digestif et des fèces étaient prélevés à chaque temps(90). Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 13. Les concentrations en minocycline du jéjunum au rectum étaient 6 à 39 fois plus élevées que celles dans le plasma entre 1h et 24h post-administration. En effet la motilité intestinale ralentit la progression du médicament dans les segments distaux et augmente ainsi sa concentration. On peut observer que la concentration en minocycline retrouvées dans les contenus digestifs et les fèces dépasse la plus grande valeur d'ECOFF des *Enterobacterales* (16mg/L) au-dessus de laquelle seules les bactéries ayant acquis des mécanismes de résistances peuvent se développer.

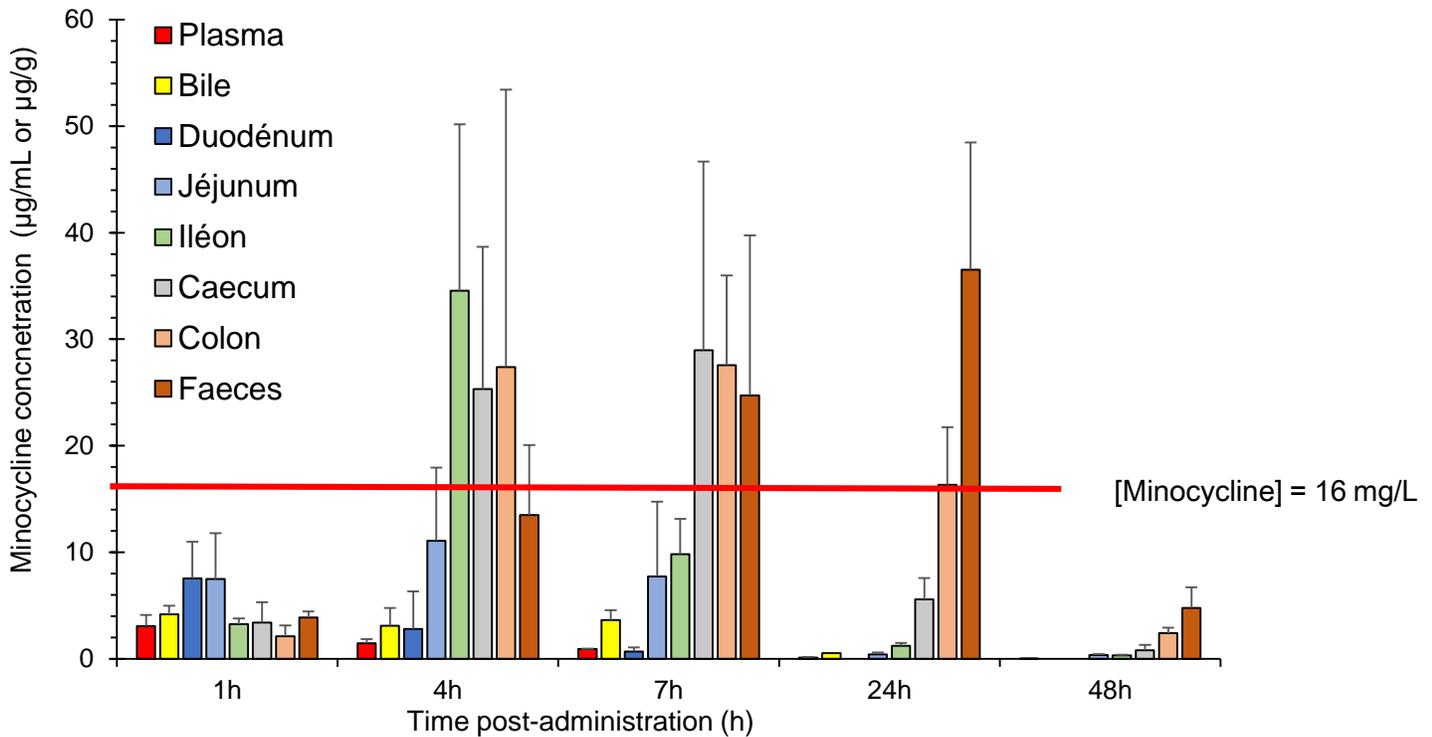


Figure 13 : Concentrations en minocycline dans le plasma et les différents segments du tube digestif après administration intraveineuse de 8mg/kg de minocycline à des porcs

2. Analyse des résultats

L'analyse des comptages bactériens obtenus entre J1 à J18 a révélé une diminution minimale, mais significative du nombre de bactéries totales au cours des jours et ce chez tous les porcs. C'est la seule observation qui ressort de ces modèles. Cette modélisation n'a donc décelé aucun impact de la minocycline sur la sélection de résistance au niveau de la flore commensale. La non significativité de nos résultats peut s'expliquer par le faible effectif de porcs utilisés lors de notre étude. Il serait judicieux, si cette manipulation est reproduite, de déterminer l'effectif de porcs qui permettrait d'augmenter la puissance statistique de celle-ci.

Puisque la minocycline est a priori présente dans le tube digestif des porcs que de J1 à J6, nous avons décidé de restreindre notre analyse aux données obtenues de J1 à

J6 (période traitement et post-traitement immédiat).

Cette analyse a révélé, comme celle réalisée entre J1 et J18, une diminution significative du nombre total de bactéries au cours du temps pour les 3 groupes. **Ces modélisations ont également mis en évidence une proportion en bactéries résistantes significativement plus élevée chez les groupes HD que chez les groupes LD et T au cours du traitement.** Il y a sélection de bactéries résistantes à la minocycline chez les individus ayant reçu une dose forte d'antibiotique (16mg/kg). Ces résultats concordent avec une étude similaire réalisée avec l'oxytétracycline pour antibiotique (91). Cette étude montre que les porcs recevant une forte dose d'oxytétracycline (20 mg/kg) présentaient pendant environ 3 semaines un niveau plus élevé de bactéries résistantes que les porcs recevant une dose plus faible (5 à 10mg/kg). Dans notre étude, la sélection de bactéries résistantes était aussi significativement plus faible chez les individus ayant reçu une faible dose de minocycline (8 mg/kg). Les animaux ayant reçu une faible dose avaient une proportion de bactéries résistantes qui n'étaient significativement pas différentes des individus témoins. On peut supposer que la fraction libre en minocycline dans le tube digestif des individus du groupe HD est plus forte que celle chez ceux du groupe LD. La concentration en minocycline serait alors plus propice à la sélection des mutants (concentration proche de la fenêtre de sélection des mutants).

Ces résultats nous ont incités à étudier l'exposition réelle du microbiote à la minocycline, et notamment à la fraction libre de minocycline dans le tube digestif.

L'analyse statistique a mis en évidence un effet phase sur LogPropor pour l'analyse entre J1 et J18 et sur LogMino et LogPropor pour l'analyse entre J1 et J6. Les individus n'étaient pas les mêmes entre la phase 2 et la phase 3, cette différence peut expliquer la significativité de l'effet phase. En effet, une différence de flore naturelle entre les deux lots peut-être à l'origine de cet effet. Un biais a aussi pu être introduit sans que nous l'ayons détecté (ex : traitement antibiotique des mères des porcelets avant la manipulation). Il aurait été intéressant d'analyser LogPropor et LogMino en étudiant les données de la phase 2 et de la phase 3 séparément afin d'identifier un potentiel effet dose sur une des phases.

Nous avons choisi de réduire l'analyse aux jours J1 à J6 pour n'avoir que les effets du traitement. Cependant, à J1, le prélèvement des fèces a été effectué en même temps que l'administration de minocycline. La minocycline n'avait donc pas encore eu le temps d'atteindre la flore intestinale au moment du prélèvement. Il aurait donc également été intéressant de modéliser LogTot, LogMino et LogPropor sur la période J2 à J6.

3. Exposition réelle de la flore intestinale à la minocycline

Compte-tenu des concentrations en minocycline mesurées dans les contenus digestifs, on s'attendait à ce qu'une forte pression de sélection soit exercée par la minocycline sur la flore commensale digestive. Toutefois, seule la minocycline sous forme libre et active peut avoir un effet sur la flore commensale, un antibiotique lié au contenu digestif à un impact plus faible sur la sélection de résistance. L'étude menée par Q. Vallé (90) s'est intéressée à l'activité de la minocycline dans le tube digestif (contenu iléal) en la comparant à son activité dans un bouillon de culture Mueller-Hinton (MH) où la totalité de l'antibiotique est sous forme libre. Pour cela, il a comparé les courbes de bactéricidie d'*Escherichia coli* exposés à la minocycline dans ces deux milieux (Figure 14).

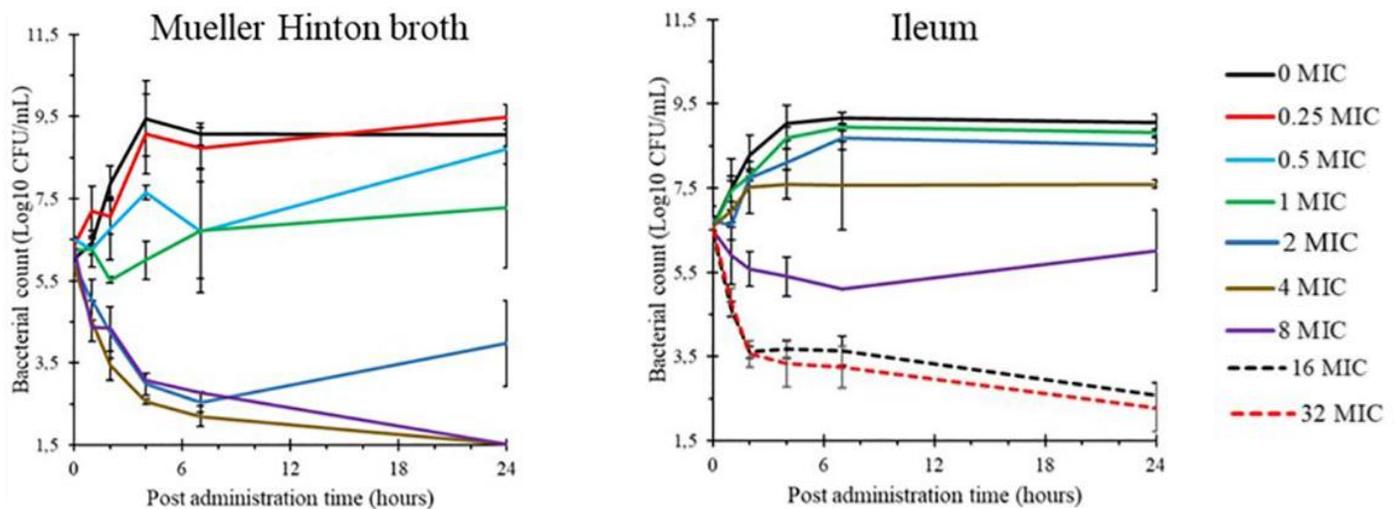


Figure 14 : Courbes de bactéricidie d'inoculum d'*Escherichia coli* en présence de concentrations différentes de minocycline dans un bouillon MH et dans du contenu intestinal

Dans l'iléon, le même effet bactériostatique que dans le milieu MH (courbe verte graphique de gauche – 1 CMI) est observé pour une concentration huit fois supérieure en minocycline (courbe violette graphique de droite -16 CMI). Pour obtenir un effet bactéricide, il faut une concentration en minocycline égale à deux fois la CMI dans le bouillon MH et seize fois supérieure à la CMI dans le contenu iléal. L'effet de la minocycline dans le contenu digestif est donc très inférieur à l'effet de la minocycline sous forme libre dans le milieu MH. Les résultats de cette étude suggèrent que la fraction non liée au contenu digestif de minocycline présente dans le milieu n'est que de 10%. La pression de sélection exercée par celle-ci sur la flore commensale est donc probablement plus faible que celle initialement attendue à partir des concentrations totales retrouvées dans le contenu digestif.

Notre étude in vivo, en administrant l'antibiotique à l'animal, a permis d'évaluer les effets de la minocycline sur la flore dans des conditions identiques à celles retrouvées en clinique avec un contenu digestif non modifié (contre du contenu filtré, stérilisé et dilué pour les expériences in vitro) et une flore complète (contre seulement quelques espèces bactériennes pour les expériences in vitro).

B. Limites de l'étude

1. Consistance des selles

La consistance des selles des porcelets a été un facteur qui a été difficile à contrôler tout au long de l'étude. En effet un porcelet avec des selles liquides a déjà des selles plus diluées qu'un individu présentant des selles moulées et cette dilution est difficilement évaluable. Afin de palier à cette inconnue, les porcelets présentant des selles liquides dès leur arrivée ont été répartis de manière équilibrée dans les trois groupes (LD, HD, et témoin) afin que la moyenne du nombre total d'*Entérobactérales* soit la même dans chaque groupe en début de manipulation. De plus l'utilisation d'un modèle statistique mixte avec les porcs pour effet aléatoire permet de s'affranchir des variabilités

interindividuelles, un porc avec des selles liquides au début de la manipulation ne provoque donc pas d'erreurs dans les résultats. Il est aussi intéressant de remarquer que les proportions d'*Entérobactérales* résistantes ne dépendaient pas de la dilution puisque les *Entérobactérales* totales et les *Entérobactérales* résistantes étaient soumises à la même dilution.

2. Méthode d'évaluation de l'émergence et de la sélection de résistance des souches bactériennes issues de la flore des porcs traités

Le choix d'une concentration en minocycline de 16mg/mL dans les milieux d'ensemencements comporte un risque d'inhiber de nombreuses souches bactériennes non sauvages. Utiliser une telle concentration nous permet de ne dénombrer que des bactéries résistantes mais ne nous permet pas de dénombrer toutes les bactéries résistantes qui sont apparues suite au traitement. Une étude menée par InTheres (92) s'est également intéressée à l'excrétion de bactéries résistantes à la minocycline lors du traitement antibiotique des mêmes porcs utilisés lors de notre étude. Afin de quantifier la résistance phénotypique des souches issues des fèces des porcs, ils ont utilisé une méthode différente de la nôtre. Ils ont procédé à la mesure de la CMI de près de 600 souches d'*Entérobactérales* recueillies dans les fèces de ces porcs avant et après traitement. Les résultats de leur étude montrent que le traitement HD induit un décalage des CMI vers des valeurs élevées, avec une médiane à 16mg/L après le traitement alors qu'elle était de 2mg/L avant le traitement. Ces résultats sont significativement différents de ceux observés pour les porcs témoins. En comparant ces CMI à l'ECOFF (epidemiological cut-off value) de souches d'*E.coli* qui est de 4mg/L, ils observent que près de 87% des souches excrétées après traitement avec la forte dose portent un mécanisme de résistance (92). Notre étude montre également une différence significative de la proportion de bactéries résistantes excrétées par le groupe HD. Toutefois dans notre étude nous sommes loin d'obtenir 87% de bactéries résistantes. On observe que 75% des valeurs de Logpropor sont comprises entre -5 et -1,7 (Figure 15) ce qui correspond à un pourcentage de bactéries résistantes compris entre 0,001% et 2%.

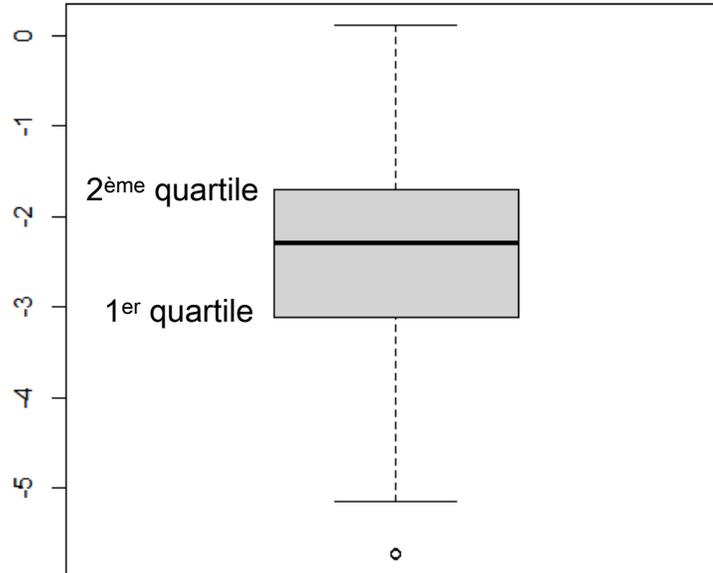


Figure 15 : Diagramme en boîte de Logpropor entre J1 et J6 pour le groupe HD

L'effet de l'antibiothérapie mesuré dans notre étude est faible et grandement variable d'un individu à l'autre. Cette différence de résultat peut s'expliquer par l'ECOFF choisi dans notre étude. En effet, nous avons choisi un ECOFF quatre fois plus élevée que celle choisi dans l'étude de Dumas et al.. Cette valeur nous assurait de ne comptabiliser que des bactéries résistantes mais empêchait aussi la croissance de bactéries résistantes pour de plus faible concentrations en minocycline. Nous avons pu sous-estimé le nombre de bactéries résistantes.

VII. Conclusion

L'utilisation d'antibiotiques pour le traitement des infections bactériennes entraîne une pression de sélection sur les bactéries commensales et favorise l'émergence et la sélection de bactéries résistantes. La résistance peut ensuite être transmise à d'autres

bactéries par transferts horizontaux et/ou verticaux.

Il a également été mis en évidence que la présence d'antibiotiques dans l'environnement bactérien à des concentrations même faibles favorisait l'émergence de résistance. Les humains, les animaux mais aussi l'environnement sont des réservoirs de bactéries résistantes qui sont interconnectés ce qui rend d'autant plus compliqué la gestion de l'antibiorésistance.

La sélection de bactéries résistantes concerne aussi bien les bactéries pathogènes ciblées que les bactéries non ciblées faisant partie de la flore commensale. Lors de notre étude sur l'impact de l'administration systémique de polymyxine B/minocycline sur la sélection de résistance dans la flore digestive chez le porc, nous avons mis en évidence que l'administration d'une dose forte d'antibiotique (16 mg/kg) par voie IV entraînait une augmentation de la proportion de bactéries résistantes chez les Entérobactérales commensales durant la période de traitement et post-traitement immédiat. L'administration d'une dose plus faible d'antibiotique (8mg/kg) n'a pas semblé avoir d'effet sur la sélection de résistances. Compte-tenu de la grande variabilité inter-individuelle, il serait intéressant d'effectuer cette même étude avec plus d'animaux pour mieux évaluer l'impact du traitement.

Lors de notre étude nous n'avons étudié la résistance phénotypiquement détectable que sur certaines bactéries facilement cultivables de la flore digestive commensale. D'autres études permettant d'évaluer les modifications génotypiques de la flore totale survenues suite au traitement sont en cours. Elles permettront de quantifier l'impact du traitement sur les gènes de résistance à la minocycline et des autres familles d'antibiotiques, sur les gènes intervenant dans la mobilité du matériel génétique par PCR quantitative et enfin sur la diversité microbienne par séquençage de l'ARNr 16S.

VIII. Bibliographie

1. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 10 avr 2018;115(15):E3463-70.
2. Schechner V, Temkin E, Harbarth S, Carmeli Y, Schwaber MJ. Epidemiological Interpretation of Studies Examining the Effect of Antibiotic Usage on Resistance. *Clin Microbiol Rev*. avr 2013;26(2):289-307.
3. PENICILLIN'S FINDER ASSAYS ITS FUTURE; Sir Alexander Fleming Says Improved Dosage Method Is Needed to Extend Use Other Scientists Praised Self-Medication Decried - The New York Times [Internet]. [cité 13 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.nytimes.com/1945/06/26/archives/penicillins-finder-assays-its-future-sir-alexander-fleming-says.html>
4. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. *P T*. avr 2015;40(4):277-83.
5. Jouy E, Madec JY, Laurent F, Haenni M. Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) : un partage entre l'Homme et l'animal ? *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*. (53):40-2.
6. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.
7. Recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination.
8. Dabi F, Pratviel E. Les Français et la résistance aux antibiotiques. :20.

9. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net).
10. Rigou S, Christo-Foroux E, Santini S, Goncharov A, Strauss J, Grosse G, et al. Metagenomic survey of the microbiome of ancient Siberian permafrost and modern Kamchatkan cryosols. *microLife*. 1 janv 2022;3:uqac003.
11. Cantón R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*. sept 2011;35(5):977-91.
12. Pagès JM. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Med Sci (Paris)*. 1 mars 2004;20(3):346-51.
13. Martinez JL, Vicente MF, Delgado-Iribarren A, Perez-Diaz JC, Baquero F, Ram H, et al. Small Plasmids Are Involved in Amoxicillin-Clavulanate Resistance in *Escherichia coli*. :1.
14. Kim DW, Cha CJ. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Exp Mol Med*. mars 2021;53(3):301-9.
15. Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Current Opinion in Microbiology*. oct 2014;21:45-50.
16. Nwokediuko I, Adeleye SA. Microbial Mimics: Strategies of Successful Pathogenicity by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Advances in Microbiology*. 11 juill 2019;1-13.
17. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*. sept 2005;3(9):722-32.
18. Edwards JS, Betts L, Frazier ML, Pollet RM, Kwong SM, Walton WG, et al. Molecular basis of antibiotic multiresistance transfer in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 févr 2013;110(8):2804-9.
19. Ploy M, Denis F, Lambert T. Les intégrons : un système original de capture de gènes

- chez les bactéries. *Med Sci (Paris)*. 2000;16(2):255.
20. Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M, Cruz F de la. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*. 2002;45(1):1-8.
 21. Dahmane N. Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICESt3 et des facteurs influençant leur mobilité. :195.
 22. In Vitro Assessment of Antimicrobial Resistance Dissemination Dynamics during Multidrug-Resistant-Bacterium Invasion Events by Using a Continuous-Culture Device | *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. [cité 20 juill 2022]. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02659-20>
 23. Humbert M. Caractérisation des systèmes d'exclusion des plasmides conjugatifs IncC. :100.
 24. Rozenberg-Arska M, Salters EC, Van Strijp JA, Hoekstra WPM, Verhoef J. Degradation of *Escherichia coli* Chromosomal and Plasmid DNA in Serum. *The Journal of general microbiology*. 1984;130(1):217-22.
 25. Charpentier X, Kay E, Schneider D, Shuman HA. Antibiotics and UV Radiation Induce Competence for Natural Transformation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*. mars 2011;193(5):1114-21.
 26. Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J, et al. Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Human Fecal Samples. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2014;58(1):606-9.
 27. Hastings P, Rosenberg S, Slack A. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends in microbiology*. 1 oct 2004;12:401-4.
 28. Khan S, Beattie TK, Knapp CW. The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria. *Ecotoxicology*. 2017;26(2):283-92.

29. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*. janv 2004;427(6969):72-4.
30. Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 1995;39(1):155-62.
31. Ferran A, Dupouy V, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2007;51(11):4163-6.
32. Kempf I, de Ploufragan-Plouzané L. Coût biologique et évolution de la résistance aux antibiotiques. :5.
33. Björkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science*. 25 févr 2000;287(5457):1479-82.
34. Livermore DM. Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Medicine*. 24 févr 2000;26(0):S014-21.
35. Vuichard-Gysin, D, Senn L, Tschudin-Sutter S, Kuster S, Buetti N, Eder M, et al. Prévention et contrôle des bactéries multi-résistantes (BMR) en dehors de flambées épidémiques - Repias : Réseau de Prévention des Infections Associées aux Soins [Internet]. [cité 10 août 2022]. Disponible sur: <https://www.preventioninfection.fr/document/prevention-et-contrôle-des-bacteries-multi-resistantes-bmr-en-dehors-de-flambees-epidemiques/>
36. Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase–Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*. 1 août 2016;63(3):310-8.
37. Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, et al. Urban wastewater

treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of The Total Environment*. mars 2013;447:345-60.

38. Ben Y, Fu C, Hu M, Liu L, Wong MH, Zheng C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research*. févr 2019;169:483-93.
39. Pruden A, Larsson DGJ, Amézquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, et al. Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environmental Health Perspectives*. août 2013;121(8):878-85.
40. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* [Internet]. 1 janv 2018 [cité 26 juill 2022];42(1). Disponible sur: <https://academic.oup.com/femsre/article/doi/10.1093/femsre/fux053/4563583>
41. Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant: Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Ecology*. avr 2007;60(1):166-76.
42. Cacace D, Fatta-Kassinos D, Manaia CM, Cytryn E, Kreuzinger N, Rizzo L, et al. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*. 1 oct 2019;162:320-30.
43. Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*. mai 2022;20(5):257-69.
44. Antibiorésistance et environnement - État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques et par les bactéries résistantes aux antibiotiques et supports génétiques de la résistance [Internet]. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2020

- [cité 14 août 2022]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/antibior%C3%A9sistance-et-environnement-%C3%A9tat-et-causes-possibles-de-la-contamination-des-milieu-0>
45. Landman C, Quévrain E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne*. juin 2016;37(6):418-23.
46. Elsevier. Traitement des infections digestives [Internet]. Elsevier Connect. [cité 17 août 2022]. Disponible sur: <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/medecine/pharmacie-clinique-et-therapeutique>
47. Ramirez J, Guarner F, Bustos Fernandez L, Maruy A, Sdepanian VL, Cohen H. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2020 [cité 17 août 2022];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.572912>
48. Pilmis B, Le Monnier A, Zahar JR. Gut Microbiota, Antibiotic Therapy and Antimicrobial Resistance: A Narrative Review. *Microorganisms*. 17 févr 2020;8(2):269.
49. Karachalios G, Charalabopoulos K. Biliary Excretion of Antimicrobial Drugs. *Chemotherapy*. 2002;48(6):280-97.
50. Tulkens PM. PHARMACOLOGIE GENERALE DES ANTIBIOTIQUES. :212.
51. Huang XZ, Zhu LB, Li ZR, Lin J. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development. *World J Clin Pediatr*. 8 nov 2013;2(4):46-53.
52. Sullivan Å, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases*. sept 2001;1(2):101-14.
53. E Lamberte L, van Schaik W. Antibiotic resistance in the commensal human gut microbiota | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 17 août 2022]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1369527422000340?token=FEAB560A16C6F51BFADFC15368467FDA535364C1183FE69A8BC8CC3B5C7CA397DDCAC8>

FB19AA294AE2FB14F78F141237&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220817173325

54. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology (Reading)*. nov 2010;156(Pt 11):3216-23.
55. Jung JY, Ahn Y, Khare S, Gokulan K, Piñeiro SA, Cerniglia CE. An in vitro study to assess the impact of tetracycline on the human intestinal microbiome. *Anaerobe*. 1 févr 2018;49:85-94.
56. Nord CE, Edlund C. Ecological Effects of Antimicrobial Agents on the Human Intestinal Microflora. :15.
57. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLOS Biology*. 18 nov 2008;6(11):e280.
58. Patangia DV, Anthony Ryan C, Dempsey E, Paul Ross R, Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *MicrobiologyOpen*. 2022;11(1):e1260.
59. Lewis BB, Buffie CG, Carter RA, Leiner I, Toussaint NC, Miller LC, et al. Loss of Microbiota-Mediated Colonization Resistance to *Clostridium difficile* Infection With Oral Vancomycin Compared With Metronidazole. *J Infect Dis*. 15 nov 2015;212(10):1656-65.
60. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology (Reading)*. nov 2010;156(Pt 11):3216-23.
61. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev*. juill 2012;25(3):450-70.

62. Zhang S, Yang Z, Sun L, Wang Z, Sun L, Xu J, et al. Clinical Observation and Prognostic Analysis of Patients With *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2020 [cité 27 sept 2022];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.577244>
63. Ahmed A, Azim A, Gurjar M, Baronia AK. Current concepts in combination antibiotic therapy for critically ill patients. *Indian J Crit Care Med.* mai 2014;18(5):310-4.
64. Klastersky J, Zinner SH. Synergistic Combinations of Antibiotics in Gram-Negative Bacillary Infections. *Clinical Infectious Diseases.* 1 mars 1982;4(2):294-301.
65. Mouton JW. Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. *Infection.* mars 1999;27(S2):S24-8.
66. Zhu M, Tse MW, Weller J, Chen J, Blainey PC. The future of antibiotics begins with discovering new combinations. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2021;1496(1):82-96.
67. Torella JP, Chait R, Kishony R. Optimal Drug Synergy in Antimicrobial Treatments. *PLOS Computational Biology.* 3 juin 2010;6(6):e1000796.
68. Wistrand-Yuen P, Olsson A, Skarp KP, Friberg LE, Nielsen EI, Lagerbäck P, et al. Evaluation of polymyxin B in combination with 13 other antibiotics against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in time-lapse microscopy and time-kill experiments. *Clinical Microbiology and Infection.* sept 2020;26(9):1214-21.
69. Zhao C, Wistrand-Yuen P, Lagerbäck P, Tängdén T, Nielsen EI, Friberg LE. Combination of polymyxin B and minocycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: interaction quantified by pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling from in vitro data. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 1 juin 2020;55(6):105941.
70. Lashinsky JN, Henig O, Pogue JM, Kaye KS. Minocycline for the Treatment of Multidrug and Extensively Drug-Resistant *A. baumannii*: A Review. *Infect Dis Ther.*

juin 2017;6(2):199-211.

71. Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, et al. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy*. janv 2019;39(1):10-39.
72. Bernier C, Dréno B. [Minocycline]. *Ann Dermatol Venerol*. mai 2001;128(5):627-37.
73. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. juin 2001;65(2):232-60.
74. Saivin S, Houin G. Clinical Pharmacokinetics of Doxycycline and Minocycline: Clinical Pharmacokinetics. *déc 1988;15(6):355-66*.
75. Cunha BA, Baron J, Cunha CB. Similarities and differences between doxycycline and minocycline: clinical and antimicrobial stewardship considerations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. janv 2018;37(1):15-20.
76. Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci*. févr 2010;67(3):419-31.
77. Vogne C. Rôles du système d'efflux MexXY-OprM dans la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux aminosides [Internet] [These de doctorat]. Besançon; 2003 [cité 7 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2003BESAA008>
78. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiology*. juin 2013;8(6):711-24.

79. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 26 nov 2014;5:643.
80. Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, et al. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy.* 2019;39(1):10-39.
81. Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, Zhao M, Lee HJ, Nation RL, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 2012;74(3):213-23.
82. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* avr 2017;30(2):557-96.
83. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care.* 2006;10(1):R27.
84. Abdelraouf K, He J, Ledesma KR, Hu M, Tam VH. Pharmacokinetics and Renal Disposition of Polymyxin B in an Animal Model. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2012;56(11):5724-7.
85. Organisation mondiale de la Santé. Lignes directrices sur les principales composantes des programmes de prévention et de contrôle des infections au niveau national et au niveau des établissements de soins de courte durée [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017 [cité 3 juill 2022]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272850>

86. World Health Organization. Integrated surveillance of antimicrobial resistance: guidance from a WHO Advisory Group [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2013 [cité 30 oct 2022]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/91778>
87. Heinritz SN, Mosenthin R, Weiss E. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutrition Research Reviews*. déc 2013;26(2):191-209.
88. Rose EC, Blikslager AT, Ziegler AL. Porcine Models of the Intestinal Microbiota: The Translational Key to Understanding How Gut Commensals Contribute to Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science* [Internet]. 2022 [cité 14 oct 2022];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.834598>
89. Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ, et al. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*. 21 nov 2011;153(1):124-33.
90. Vallé Q, Roques BB, Bousquet-Mélou A, Dahlhaus D, Ramon-Portugal F, Dupouy V, et al. Prediction of Minocycline Activity in the Gut From a Pig Preclinical Model Using a Pharmacokinetic -Pharmacodynamic Approach. *Front Microbiol*. 9 juill 2021;12:671376.
91. Græsbøll K, Damborg P, Møllerup A, Herrero-Fresno A, Larsen I, Holm A, et al. Effect of Tetracycline Dose and Treatment Mode on Selection of Resistant Coliform Bacteria in Nursery Pigs. McBain AJ, éditeur. *Appl Environ Microbiol*. 15 juin 2017;83(12):e00538-17.
92. Dumas M. Impact de différentes doses de minocycline chez le porc sur la dynamique de la résistance aux antibiotiques et des populations microbiennes dans les fèces. :43.

SLIM Aymelle

Impact de l'administration systemique de polymyxine b et de minocycline sur la selection de resistance dans la flore digestive chez le porc.

Résumé :

L'administration d'antibiotiques pour le traitement des infections bactériennes entraîne une pression de sélection sur les bactéries commensales et favorise l'émergence et la sélection de bactéries résistantes. L'objectif de cette thèse était de déterminer l'impact de l'administration systémique de polymyxine B/minocycline sur la sélection de résistance dans la flore digestive chez le porc. Pour cela, nous avons prélevé les fèces de 24 porcelets avant, pendant et après un traitement par voie intraveineuse de minocycline. Ces porcelets étaient divisés en trois groupes, le groupe HD (high-dose) recevant une forte dose d'antibiotique (16 mg/kg), le groupe LD (low-dose) recevant une faible dose (8mg/kg) et le groupe T (témoin) ne recevant pas d'antibiotique. Nous avons mesuré l'impact de la combinaison de traitement sur la flore bactérienne facilement cultivable, les *Entérobactérales*. Nous avons déterminé l'évolution du nombre d'*Entérobactérales* en UFC/g de fèces et de la proportion d'*Entérobactérales* résistantes à la minocycline chez les trois groupes de porcs. Nous avons mis en évidence que l'administration d'une dose forte d'antibiotique (16 mg/kg) par voie intraveineuse entraînait une augmentation de la proportion de bactéries résistantes chez les *Entérobactérales* commensales durant la période de traitement et post-traitement immédiat. L'étude des modifications génotypiques de la flore totale survenues suite au traitement permettra de mieux caractériser l'évolution du microbiote au cours du traitement.

Mots clés : Antibiorésistance, antibiotiques, résistances, minocycline, polymyxine B, flore digestive, commensale, microbiote, resistome, porcs, feces, traitement, combinaison,

Summary :

The administration of antibiotics for the treatment of bacterial infections results in selection pressure on commensal bacteria and promotes the emergence and selection of resistant bacteria. The objective of this thesis was to determine the impact of systemic administration of polymyxin B/minocycline on resistance selection in the digestive flora of pigs. For this purpose, we collected feces from 24 piglets before, during and after intravenous minocycline treatment. These piglets were divided into three groups, the HD (high-dose) group receiving a high dose of antibiotic (16 mg/kg), the LD (low-dose) group receiving a low dose (8mg/kg) and the T (control) group receiving no antibiotic. We measured the impact of the treatment combination on the easily cultivated bacterial flora, Enterobacteriaceae. We determined the evolution of the number of Enterobacteriaceae in CFU/g feces and the proportion of minocycline-resistant Enterobacteriaceae in the three groups of pigs. We

demonstrated that administration of a high dose of antibiotic (16 mg/kg) by the intravenous route resulted in an increase in the proportion of resistant bacteria in commensal Enterobacteriaceae during the treatment period and immediately after treatment. The study of genotypic changes in the total flora following treatment will allow a better characterization of the evolution of the microbiota during treatment.

Key words : Antibiotic resistance, antibiotics, resistance, minocycline, polymyxin B, digestive flora, commensal, microbiota, resistome, pigs, faeces, treatment, combination,