HAL
open science

Etude de l'impact de probiotique sur la réduction d'Escherichia coli résistant aux céphalosporines de troisième génération dans le microbiote intestinal porcin

Gwénaëlle Mourand

▶ **To cite this version:**

Gwénaëlle Mourand. Etude de l'impact de probiotique sur la réduction d'Escherichia coli résistant aux céphalosporines de troisième génération dans le microbiote intestinal porcin. Sciences de l'environnement. 2016. hal-01469794

HAL Id: hal-01469794

https://ephe.hal.science/hal-01469794

Submitted on 16 Feb 2017

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.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la vie et de la terre

Mémoire

Présenté par Gwénaëlle Mourand

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Etudes

Étude de l'impact de probiotique sur la réduction d'*E. coli* résistant aux céphalosporines de troisième génération dans le microbiote intestinal porcin

Soutenu le…… devant le jury suivant

Pr Laurence Mathieu	Président de jury
Dr Isabelle Kempf	Tuteur scientifique
Pr Thierry Wirth	Tuteur pédagogique
Dr Catherine Belloc	Rapporteur
Pr Gwénnola Ermel	Examinateur
Mme Agnès Perrin-Guyomard	Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de

Dr Isabelle Kempf

Agence Nationnal de Sécurité Sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Site de Ploufragan – Unité de mycoplasmologie et de bactériologie

Directeur : Dr Gilles Salvat

Et de

Pr Thierry Wirth

Laboratoire EPHE de Biologie intégrative des populations

Directeur : Michel Veuille

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Dr Catherine Belloc d'avoir accepté d'être mon rapporteur et d'avoir pris le temps d'évaluer ce manuscrit. Je remercie également Pr Gwénolla Ermel et Mme Agnès Perrin-Gyuomard d'avoir accepté d'être examinateur et Pr Laurence Mathieu de présider ce jury. Je voudrais aussi remercier Pr Thierry Wirth pour avoir suivi ce travail en tant que tuteur pédagogique.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Mr Gilles Salvat, directeur de l'Anses Ploufragan/Plouzané pour m'avoir permis de suivre cette formation.

Je tiens à remercier tout particulièrement Isabelle Kempf, ma tutrice scientifique. Je te remercie de m'avoir accordé ta confiance, pour ta disponibilité et tes conseils et surtout, merci pour tout ce que tu m'as appris depuis plus de 10 ans.

Je remercie également Frédéric Paboeuf et toute l'équipe du SPPAE pour leur aide concernant les différentes expérimentations *in vivo*, étape primordiale de mon projet. Merci également à Stéphanie Bougeard pour son aide dans les analyses statistiques.

Je tiens également à remercier toute l'équipe de MB, à savoir Véro, Maëlan, Emeline, Florence, Odile, Séverine, Marco, Anne et une mention spéciale pour Marie-Pierre qui m'a vraiment beaucoup aidée dans la préparation des milieux de culture. Merci à toi Corinne pour tous tes conseils en biologie moléculaire. Bien sûr, merci à ma « coloc » de bureau Laëtitia d'avoir supporté mes râleries. Je te tiens à remercier tout particulièrement Sandrine et Eric. Merci à toi Sandrine pour tes conseils scientifiques, pour ta bonne humeur et un grand merci pour ton soutien et tes encouragements. Merci à toi Eric pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton écoute et tes nombreux conseils en antibiorésistance.

Je remercie également Aurélie Le Roux, collègue de GVB, ancienne collègue de MB et bien plus que ça. Merci pour ta bonne humeur, tes petits messages de soutien lors de mes déplacements.

Merci à Hélène et Marine qui sont passées par l'EPHE, je les remercie de leurs encouragements et de leurs conseils.

Je termine par remercier ma famille, mes parents, ma grande sœur Pat, mon grand frère et mes amis. Merci papa et maman de m'avoir toujours soutenue malgré un cursus scolaire chaotique. Je tenais également à remercier Sam et Alex, mes compères de l'IUT de Quimper, pour leurs encouragements et d'avoir toujours été là. Et bien sûr un énorme merci à mon mari Ludo pour m'avoir convaincue de me lancer dans cette aventure, de m'avoir soutenue tous les jours et de me rebooster dans les moments de doutes. Merci à mes deux amours, Jules et Clémence qui ont été très patients avec leur maman pas toujours disponible.

Table des matières

Remerciements ..... *i*

Liste des abréviations ..... *v*

Liste des tableaux, des figures et des annexes ..... *vii*

Liste des figures ..... **vii**

Liste des tableaux ..... **vii**

Liste des annexes ..... **ix**

Introduction *1*

Synthèse bibliographique *2*

I- *Escherichia coli* **2**

1- Introduction 2
2- Pathogénicité intestinale des *E. coli* 4
2-1 *E. coli* Entérotoxinogène (ETEC) 5
2-2 *E. coli* Entéropathogène (EPEC) 6
2-3 *E. coli* Entérohémorragique (EHEC) 7
2-4 ExPEC 9
2-5 Focus sur la souche *E. coli* TN03 9
3- Transfert horizontal de gènes et éléments génétiques mobiles 10
3-1 Transfert horizontal de gènes 11
3-2 Eléments génétiques mobiles 12
4- Les plasmides 14
5- Classification phylogénétique 15

II- Le microbiote intestinal porcin **19**

III- Les probiotiques **20**

1- *E. coli* ED1a 21
2- *E. coli* Nissle 1917 21

IV- Les antibiotiques **22**

1- Définition et réglementation 22
2- Usage des antibiotiques en production porcine 23
3- Les céphalosporines de troisième génération (C3G) 27
3-1 Classification 27
3-2 Mécanisme d'action 29
3-3 Résistance aux β-lactamines : les β-lactamases 31
3-3-1 Classification des β-lactamases 31
3-3-2 Focus sur les BLSE de type CTX-M 32
3-3-3 Prévalence et facteurs de risque 34

Matériels et méthodes *38*

I- Mise en place des différentes PCR quantitatives **38**

1- Spécificité analytique 38
2- Sensibilité et spécificité de diagnostic 38
3- Limite de détection 39

II- Préparation des souches utilisées lors des différentes expérimentations **40**

1- Les différentes souches 40
2- Préparation de la souche résistante : *E. coli* M63 40

2-1 Préparation de la souche receveuse 41
2-2 Préparation de la souche donneuse 41
2-3 Conjugaison entre la souche donneuse et la souche receveuse 41

III- Les protocoles expérimentaux 42
1- Préparation des inoculums 42
1-1 Préparation des souches résistantes *E. coli* M63 et *E. coli* TN03 42
1-2 Préparation des cultures des probiotiques *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle 1917 42
2- Les protocoles expérimentaux 43
2-1 Premier essai expérimental 43
2-2 Deuxième essai expérimental 44
2-3 Troisième essai expérimental 46
2-4 Conservation des prélèvements 47

IV- Dénombrement, caractérisation et conservation des entérobactéries CTX^R 47
1- Dénombrement des entérobactéries CTX^R 47
2- Lysat cellulaire et conservation des entérobactéries CTX^R 47
3- Caractérisation des souches 48
3-1 PCR d'identification *Escherichia coli* 49
3-1-1 PCR spécifique d'*Escherichia coli* 49
3-1-2 PCR spécifique d'*Escherichia coli* en temps réel 49
3-2 PCR spécifique de la souche *E. coli* TN03 49
3-3 PCR de détection du gène bla_{CTX-M} du groupe 1 49
3-3-1 PCR classique des gènes bla_{CTX-M} 49
3-3-2 PCR en temps réel spécifique du gène $bla_{CTX-M-1}$ 50
3-4 PCR de détection des probiotiques 50
3-5 Typage phylogénétique pour *E. coli* 50
3-6 Electrophorèse en champ pulsé 52

V- Quantification des *E. coli* totaux, *E. coli* ED1a, *E. coli* Nissle et du gène $bla_{CTX-M-1}$ 53
1- Extraction d'ADN 53
2- Quantification des *E. coli* totaux, de la souche *E. coli* ED1a et de la souche *E. coli* Nissle 54
2-1 Construction des gammes étalon avec de l'ADN purifié 54
2-2 Les amorces et les sondes des PCR quantitative 54
2-3 Protocole des PCR quantitative 54
3- Quantification du gène $bla_{CTX-M-1}$ 54
3-1 Clonage du gène $bla_{CTX-M-1}$ 54
3-2 Construction des gammes étalon avec le plasmide contenant le gène $bla_{CTX-M-1}$ 56

VI- Outils informatiques et statistiques 57

***Résultats* 58**

I- Caractéristiques des PCR quantitatives 58
1- Détermination de la sensibilité (Se) et de la spécificité (Sp) diagnostiques de la méthode 58
2- Limite de détection 59
3- Spécificité analytique 60

II- Préparation de la souche résistante : *E. coli* M63 61

III- Résultats des protocoles expérimentaux 61
1- 1er Essai 61
1-1 Symptômes et croissance des porcs 61
1-2 Résultats d'analyses des matières fécales 62
1-2-1 Analyses bactériologiques des matières fécales 62
1-2-2 Analyses moléculaires des matières fécales 64

1-3 Résultats d'analyses des prélèvements de lisiers 66
1-3-1 Dénombrement des entérobactéries CTX^{R} 66
1-3-2 Analyses moléculaires des lisiers 66
1-4 Conclusion de l'essai 1 68
2- 2ème essai 68
2-1 Symptômes et croissance des porcs 69
2-2 Résultats d'analyses des matières fécales 69
2-2-1 Analyses bactériologiques des matières fécales 69
2-2-2 Analyses moléculaires des matières fécales 71
2-3 Résultats d'analyses des prélèvements de lisier 73
2-3-1 Analyses bactériologiques des lisiers 73
2-3-2 Analyses moléculaires des lisiers 75
2-4 Conclusion de l'essai 2 76
3- 3ème essai 76
3-1 Symptômes et croissance des porcs 77
3-2 Résultats d'analyses des matières fécales 78
3-2-1 Analyses bactériologiques des matières fécales 78
3-2-2- Analyses moléculaires des matières fécales 81
3-3 Conclusion de l'essai 3 83
4- Conclusion des différents essais 83

***Discussion* 85**

***Conclusions et perspectives* 93**

***Bibliographies* 94**

***Annexes* 102**

Liste des abréviations

A/E : Attachement/Effacement
ADN : Acide désoxyribonucléique
AIEC : *E. coli* adhérente invasive
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANMV : Agence Nationale du Médicament Vétérinaire
Anses : Agence Française de Sécurité Sanitaire Alimentation Environnement Travail
APEC : *E .coli* pathogène aviaire
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messager
ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal
ARNt : Acide Ribonucléique de transfert
BFP : bundle-forming pili
BLSE : β-lactamases à spectre étendu
C : Concentration
C1G : Céphalosporines de première génération
C2G : Céphalosporine de deuxième génération
C3G : Céphalosporine de troisième génération
C4G : Céphalosporine de quatrième génération
Cf : concentration finale
CF : facteur de colonisation
CNF : Facteur cytotoxique nécrosant
CTX : Céfotaxime
CTX-M : Céfotaximase
CTX^R : Résistant à la céfotaxime
CTX^S : Sensible à la céfotaxime
DAEC : *E. coli* à adhésion diffuse
dNTP : Désoxyribonucléotides Triphosphate
EAEC : *E. coli* entéroaggrégative
ECP : Electrophorèse en champ pulsé
ECT : Ecart-type
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EHEC : *E. coli* entérohémorragique
EIEC : *E. coli* entéroinvasive
EMA : Agence européenne du Médicament
EOPS : Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés
EPEC : *E. coli* entéropathogène
ESVAC : European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption
ETEC : *E. coli* entérotoxinogène
ETEC : *E. coli* entérotoxinogène
ExPEC : *E. coli* pathogène extra-intestinaux
FN : Faux négatif
FP : Faux positif
g : Gramme
HC : Colique hémorragique
HUS : Syndrôme hémolytique urémique
Inc : Incompatibilité

IPEC	: *E.coli* responsable de pathologie intestinale
J	: Jour
Kb	: Kilo paire de bases
Kg	: Kilogramme
LEE	: Locus d'effacement des entérocytes
Lpp	: Lipoprotéine
LPS	: Lipopolysaccharide
LT	: Toxine thermolabile
m	: Moyenne
MC	: Mac Conkey
MDR	: Multirésistance aux antibiotiques
MH	: Mueller Hinton
min	: Minute
Na	: Nombre d'Avogadro
NaCl	: Chlorure de sodium
NMEC	: *E. coli* responsable de méningite néonatale
PAI	: Ilot de pathogénicité
Pb	: Paire de bases
PCR	: Polymerase Chain reaction
PLP	: Protéine liant la pénicilline
R-C3G	: Résistant aux céphalosporines de troisième génération
RESAPATH	: réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes
Rif	: Rifampicine
Rif^R	: Résistant à la Rifampicine
Rif^S	: Sensible à la Rifampicine
s	: Seconde
SDS	: Sodium docedyl sulfate
Se	: sensibilité de diagnostic
SEPEC	: *E. coli* septicémique
Sp	: spécificité de diagnostic
ST	: Séquence type
ST	: Toxine thermostable
STc	: Séquence type complexe
STEC	: *E. coli* productrice de shiga-toxine
STEC	: *E. coli* producteur de shiga toxine
Stx	: Shigatoxine
UFC	: Unité Formant Colonie
UPEC	: *E. coli* uropathogène
UPEC	: *E. coli* uropathogène
UV	: Ultra-violet
VN	: Vrai négatif
VP	: Vrai positif
VRE	: *Enterococcus* résistant à la vancomycine

Liste des tableaux, des figures et des annexes

Liste des figures

Figure I : *Mécanismes de transfert de l'ADN au sein des bactéries (Gyles & Boerlin 2014)* 11
Figure II : *Distribution des groupes phylogénétiques A, B1, B2, D, AxB1 et ABD dans un arbre minimal couvrant (MS_{TREE}) des 275 ST d'E. coli en fonction du degré de partage allélique.* 17
Figure III: *Succession temporelle des genres bactériens dans les fécès de porc (Lallès JP. 2004)* 19
Figure IV: *Variation du microbiote intestinal en fonction de la situation dans l'intestin (Sekirov et al. 2010)* .. 20
Figure V: *Évolution du poids vif traité de porcs selon la voie d'administration (en tonnes) (Anses-ANMV 2014)* 24
Figure VI: *Évolution de la part des familles d'antibiotiques dans le poids vif traité des porcs (Anses-ANMV 2014)* 25
Figure VII: *Ventes totales d'agents antimicrobiens vétérinaires pour les espèces productrices de denrées alimentaires (y compris les chevaux) en mg/PCU, au cours des années 2010 à 2012, pour les 26 pays de l'UE (EMA 2014)* 26
Figure VIII: *Évolution de l'exposition des porcs aux céphalosporines (Anses-ANMV 2014)* 27
Figure IX: *Structure chimique des céphalosporines (Macheboeuf et al. 2006)* 29
Figure X: *Arbre phylogénétique montrant la similarité des enzymes CTX-M et les membres des différents groupes (D'Andrea et al. 2013)* 33
Figure XI: *Évolution des proportions de souches pathogènes d'E. coli non-sensibles au ceftiofur chez les porcs, poules/poulets et dindes (2006-2014) (Anses 2015)* 36
Figure XII: *Calendrier expérimental de l'essai 1* 44
Figure XIII: *Calendrier expérimental de l'essai 2* 45
Figure XIV: *Calendrier expérimental de l'essai 3* 46
Figure XV: *Caractéristiques du vecteur PCR4-TOPO et de la séquence entourant le site de clonage* 56
Figure XVI: *Évolution de la population d'entérobactéries CTX^R dans le lisier prélevé à J7 et stocké en chambre froide lors du 1er essai* 66
Figure XVII: *Évolution de la population d'entérobactéries CTX^R lors du 2ème essai* 70
Figure XVIII : *Répartition des groupes phylogénétiques en fonction de l'origine des isolats* 74
Figure XIX: *Évolution de la population d'entérobactéries CTX^R présente dans les matières fécales des porcs inoculés avec une souche résistante et en présence d'un probiotique lors du 3ème essai* 79

Liste des tableaux

Tableau 1: *Gènes et éléments génétiques mobiles impliqués dans les pathologies porcines* 5
Tableau 2: *Répartition des ventes 2013 entres les différentes espèces en tonnage de matière active et en quantité de matière active par kilogramme animal (Anses-ANMV 2014)* 24
Tableau 3: *Classification des β-lactamines (Jehl 2004)* 28
Tableau 4: *Tableau représentant les différentes classes de céphalosporines associées à leur spectre d'action (Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the Committee for Medicinal Products for Veterinary 2009)* .. 28
Tableau 5: *Protéines liant la pénicilline intervenant dans la synthèse du peptidoglycane chez E. coli (Typas et al. 2012)* 30
Tableau 6: *Classification des β-lactamases selon Amber (Pfeifer et al. 2010)* 32
Tableau 7: *Classification des BLSE de type CTX-M (Poirel et al. 2012)* 33

Tableau 8: *Les différentes souches testées ainsi que le nombre de souches pour l'évaluation de la spécificité analytique* 39
Tableau 9: *Echantillons testés en PCR afin de déterminer la sensibilité (Se) et la spécificité (sp) de diagnostiques* 39
Tableau 10: *Calcul de la sensibilité (Se) et de la spécificité (Sp) diagnostiques de la méthode* 39
Tableau 11: *Caractéristiques des souches utilisées pour ce projet* 40
Tableau 12: *Protocole expérimental de l'essai 1* 43
Tableau 13: *Protocole expérimental de l'essai 2* 45
Tableau 14: *Dispositif expérimental de l'essai 3* 46
Tableau 15: *Protocole de la préparation cellulaire et la conservation d'un isolat* 48
Tableau 16: *Séquences nucléotidiques des différentes amorces et la taille des produits amplifiés pour le typage phylogénétique* 51
Tableau 17: *Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour le clonage du gène* $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ 55
Tableau 18: *Sensibilité (Se) et spécificité (Sp) diagnostiques des différentes méthodes PCR en temps réel* 58
Tableau 19: *Détermination des limites de détection des qPCR E. coli, qPCR E. coli ED1a, qPCR E. coli Nissle et qPCR blaCTX-M groupe 1* 60
Tableau 20: *Résultat de l'évaluation de la spécificité analytique* 61
Tableau 21: *Gains de poids moyens des animaux (kg) lors du 1er essai* 61
Tableau 22: *Moyennes en log 10 des entérobactéries isolées sur milieu Mac Conkey supplémenté avec 2 mg/l de CTX et nombre de porcs détectés positifs lors du 1er essai* 62
Tableau 23: *Pourcentage et nombre de colonies résistantes à la rifampicine parmi les colonies repiquées sur MC + Rif (1er essai)* 63
Tableau 24: *Groupes phylogénétiques des 104 isolats d'E. coli (87 isolats* Rif^S *et 14 isolats* Rif^R*) (1er essai)* 64
Tableau 25: *Récapitulatif des moyennes et écarts-types du nombre de copies et du nombre d'échantillons positifs pour la détection d'E. coli, d'E. coli ED1a et du gène* $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ *à partir des matières fécales lors du 1er essai (en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN) (1er essai)* 66
*Tableau 26**:** Évolution du nombre de copies d'E. coli, E. coli ED1a et du gène* $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ *dans les lisiers au moment du prélèvement et après stockage en chambre froide lors du 1er essai (en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN)* 68
Tableau 27: *Poids moyen des porcs (kg) dans les différents lots lors du 2ème essai* 69
Tableau 28: *Groupe phylogénétique des isolats* CTX^R *et* Rif^S *isolés de matières fécales lors du 2ème essai* 71
Tableau 29: *Moyennes et écart-types du nombre de copies et du nombre d'échantillons positifs pour la détection d'E. coli, d'E. coli ED1a et du gène* $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ *pour les prélèvements de matières fécales du 2ème essai (en log 10 du nombre de copies)* 73
Tableau 30: *Dénombrement des entérobactéries résistants aux C3G dans les lisiers collectés à J0, J8, J13 ou J27 et analysés à T0, après une semaine (S+1) ou deux mois (M+2) (log10 UFC/ml) (2ème essai)* 73
Tableau 31: *Groupe phylogénétique des isolats* CTX^R *et* Rif^S *isolés à partir des lisiers lors du 2ème essai* 74
Tableau 32: *Évolution des nombres de copies d'E. coli et d'E. coli ED1a dans les lisiers récoltés à différentes dates et stockés à température ambiante lors du 2ème essai (en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN)* 76
Tableau 33: *Titres des probiotiques administrés aux porcs au cours du 3ème essai (UFC/porc)* 77
Tableau 34: *Gains de poids (en kg) des différents lots lors du 3ème essai* 78
Tableau 35: *Pourcentage et le nombre d'E. coli appartenant aux souches E. coli* CTX^R *inoculés (E. coli M63 ou E. coli TN03) obtenus lors du 3ème essai* 80
Tableau 36: *Répartition des différents groupes phylogénétique du lot B1 en fonction des jours de prélèvements (3ème essai)* 81
Tableau 37: *Moyennes du nombre de copies des cibles E. coli, E. coli ED1a, E. coli Nissle et du gène blaCTX-M-1 et nombres de prélèvements positifs de matières fécales pour les probiotiques et le gène blaCTX-M-1 (en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN) (3ème essai)* 83

Liste des annexes

Annexe 1 : *Tableau récapitulatif des séquences nucléotidiques des amorces et de la taille des produits amplifiés utilisés pour les différentes PCR classiques* *102*
Annexe 2 : *Tableau récapitulatif des séquences nucléotidiques des amorces et des sondes utilisés pour les différentes PCR en temps réel* *103*
Annexe 3: *Récapitulatif des différents programmes de PCR classique* *104*
Annexe 4: *Récapitulatif des différents programmes de PCR temps réel* *105*
Annexe 5: *Typage phylogénétique* *106*
Annexe 6: *Synthèse des résultats concernant les effets de l'administration d'E. coli ED1a ou E. coli Nissle sur la population entérobactéries* CTX^R *chez les porcs inoculés avec E. coli M63 ou E. coli TN03* *107*

Introduction

Vers le milieu des années 1940, l'usage des antibiotiques a débuté en médecine humaine et en médecine vétérinaire suite à la découverte de la pénicilline par A. Fleming en 1929. Parallèlement à l'augmentation des molécules disponibles et à leurs utilisations, les bactéries résistantes ont fait leurs apparitions. Parmi les antibiotiques jugés critiques pour la santé humaine, figurent les céphalosporines de troisième génération (C3G) (Anses 2014). Les entérobactéries peuvent résister à ces antibiotiques via différents mécanismes ; les plus problématiques pour la santé humaine comme pour la médecine vétérinaire sont la présence de plasmides conjugatifs codant pour la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Ces enzymes ont été d'abord décrites dans les années 1980 chez des bactéries pathogènes isolées de personnes hospitalisées, puis dans les années 2000 à partir de souches pathogènes chez les animaux. Elles ont été ensuite mises en évidence dans le microbiote intestinal des animaux arrivant à l'abattoir ou dans leur viande (Anses 2010). Les BLSE les plus fréquentes sont les céfotaximases (CTX-M) codées par les gènes $bla_{\text{CTX-M}}$, plus particulièrement en France les gènes $bla_{\text{CTX-M}}$ du groupe 1 (Philipon 2013). Ces gènes sont très souvent portés par des plasmides qui hébergent fréquemment des déterminants codant pour des résistances pour d'autres antibiotiques, pouvant conduire à un échec thérapeutique. Ces éléments génétiques mobiles sont susceptibles d'être transmis à d'autres entérobactéries. La forte diminution de l'utilisation des céphalosporines chez les porcs charcutiers en France depuis quelques années a permis de réduire la prévalence de la résistance à cette famille d'antibiotiques (Anses-ANMV 2014; Anses 2015), mais il nous semble également judicieux de développer des stratégies permettant de réduire le portage des bactéries résistantes aux antibiotiques, afin de préserver leur efficacité. Ce projet consiste à contrecarrer le développement d'entérobactéries résistantes aux C3G dans la flore intestinale des porcs, en leur administrant des probiotiques. En effet, depuis quelques années, de nombreuses souches de probiotiques sont utilisées en production porcine. Des études ont en effet montré leurs capacités à stabiliser les différentes populations du microbiote intestinal et à limiter l'implantation des bactéries pathogènes opportunistes (Hou *et al.* 2015).

Après une étude bibliographique concernant la bactérie *Escherichia coli*, les probiotiques, les C3G et les mécanismes de résistance vis-à-vis de ces molécules, nous présenterons dans ce mémoire trois protocoles expérimentaux réalisés sur des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS). Au cours de ces essais, nous avons inoculé les porcelets avec la souche *E. coli* M63 porteuse du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ préparée au laboratoire ou la souche *E. coli* TN03 porteuse du gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$, puis les animaux ont reçu ou non l'une des deux souches d'*E. coli* (*E. coli* ED1a ou *E. coli* Nissle 1917), bonnes colonisatrices du microbiote intestinal. Nous avons alors détecté et quantifié les différentes souches et le gène de résistance $bla_{\text{CTX-M}}$ du groupe 1 dans les matières fécales des porcelets afin d'évaluer la capacité des probiotiques à entrer en compétition avec les entérobactéries résistantes et réduire, voire éliminer leur présence dans la flore des animaux. La description des résultats des trois essais sera suivie d'une discussion et d'une conclusion/perspectives.

Synthèse bibliographique

I- *Escherichia coli*

1- Introduction

Escherichia coli est un bacille Gram négatif appartenant au phylum *Protobacteria*, à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Escherichia*. Le genre *Escherichia* comprend cinq espèces : *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et une très rare qui a été isolée de la blatte, d'où son nom *E. blattae*. Découverte en 1885 par Théodor Escherich dans des selles de chèvres, les *E. coli* sont des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud, qu'ils colonisent dès les premières heures après la naissance. Les *E. coli* n'existent pas normalement dans l'eau et le sol, leur présence est donc un indicateur de contamination fécale. Dans les années 1990, Ils étaient considérés comme l'espèce dominante de la flore aérobie du microbiote intestinal (LeMinor 1990). Des études récentes de métagénomique du microbiote intestinal ont permis de mettre en évidence cinq principaux phylums, englobant *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Fusobacteria*. Chez l'adulte, 90 % du microbiote intestinal sont représentés par les phylums *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (Milani et al. 2016). Ces récentes données indiquent donc que l'espèce *E. coli* appartenant au phylum P*rotobacteria* n'est pas majoritaire au sein du microbiote intestinal humain.

La plupart des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont composés d'une enveloppe cellulaire et sont mobiles grâce à une ciliature péritriche mais certaines sont immobiles comme *Klebsiella* et *Yersinia pestis*. Elles peuvent posséder des appendices protéiques rigides appelés pili ou fimbriae, qui leur donnent des propriétés d'adhésion aux cellules eucaryotes. Certaines peuvent présenter une capsule, cette structure est habituellement rencontrée chez *Klebsiella* mais les *E. coli* peuvent exceptionnellement en posséder une (LeMinor 1990). Ces bactéries ne sporulent pas, sont aéro-anaérobies facultatif et se cultivent sur milieu ordinaire à base d'extrait de viande. Elles fermentent le glucose organique avec ou sans production de gaz, ce sont donc des bactéries chimio-organotrophes (Bergey 1984). Les entérobactéries possèdent une nitrate-réductase à l'exception de certaines souches d'*Erwinia* et de très rares mutants, ainsi qu'une catalase à l'exception de *Shigella dysenteriae* (LeMinor 1990). Chez *E. coli*, le nucléoïde se compose d'une molécule d'ADN circulaire d'environ 4,6 Mb compactée environ 1000 fois, de plusieurs ARN et de plus de 200 protéines de liaison à l'ADN, parmi lesquelles un ensemble de protéines dites « histone-like » dont les protéines HU, H-NS, IHF et FIS. Ces protéines interviennent directement ou indirectement dans l'expression de nombreux gènes essentiels à la vie de la cellule et régulent des gènes exprimés lors de changements environnementaux (Macvanin & Adhya 2012). L'absence de membrane nucléaire permet un contact direct entre l'ADN et le cytoplasme ; le transfert d'informations génétiques est donc très rapide. L'examen du chromosome d'*E. coli* a montré en effet que l'ADN bactérien est couvert dans certaines régions par de nombreux polysomes. Ces polysomes

correspondent à l'association de l'ARNm à un ribosome. Ces éléments sont placés en périphérie des zones nucléaires, ce qui suggère que les gènes en état de transcription ne sont pas localisés n'importe où dans le chromosome, mais viennent se placer en périphérie (LeMinor 1990). Une cellule d'*E. coli* peut contenir jusqu'à 15000 ribosomes, ce nombre étant fonction du taux de croissance. Des concentrations particulières en Mg^{2+} et en K^{+} sont nécessaires à leur intégrité et leur bon fonctionnement (LeMinor 1990; Prescott 1995). Un ribosome bactérien 70S est séparé en deux sous-unités ; une grande sous-unité 50S et une petite sous-unité 30S. La sous-unité 50S contient deux acides ribonucléiques ribosomal (ARNr 23S et ARNr 5S) et trente-trois protéines L. La petite sous-unité 30S contient un ARNr 16S et vingt-et-une protéines S. Le ribosome est le lieu de la synthèse protéique. Les ribosomes sont présents dans le cytoplasme et aussi faiblement liés à la membrane cytoplasmique. Les ribosomes présents dans le cytoplasme synthétisent les protéines intracellulaires, tandis que les ribosomes liés à la membrane cytoplasmique fabriquent les protéines à exporter. Un ribosome décode un ARN messager (ARNm) avec l'aide d'adaptateurs, les ARN de transfert (ARNt). La synthèse protéique se déroule en trois étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison (Achenbach & Nierhaus 2015). L'analyse de multiples génomes bactériens a démontré l'existence d'un « core génome », comprenant les déterminants génétiques codant les voies métaboliques fondamentales, ainsi les caractéristiques structurales de la cellule, tels que les protéines ribosomales et les composants de la paroi cellulaire. Cette analyse a également montré la présence d'un « génome accessoire » comprenant des informations génétiques pouvant être avantageuses dans des conditions spécifiques de croissance, telles que l'infection, la colonisation ou la croissance dans des niches spécifiques. Le « groupe génétique flexible » comprend souvent divers éléments génétiques mobiles tels que des plasmides, bactériophage, séquences d'insertion (IS) et transposons (Hacker *et al.* 2004) et peuvent être transférables d'une bactérie à l'autre.

Initialement, les *E. coli* sont des bactéries commensales non pathogènes chez l'homme et les animaux. Cependant, des souches d'*E. coli* ont été mises en causes dans des maladies intestinales et extra-intestinales (Mainil 2013). Les *E. coli* pathogènes ont acquis des éléments de virulence comme des toxines, des adhésines qui peuvent être portés sur des plasmides de virulences et des îlots de pathogénicité grâce à des échanges génétiques (Nataro & Kaper 1998; Ho *et al.* 2013). Ces souches ont donc évolué grâce à une modification des gènes existants, une perte ou un gain de gènes entrainant une réorganisation dans le génome des *E. coli* (Bielaszewska *et al.* 2007a). Par exemple, Hayashi et *al.* ont montré que la souche *E. coli* O157 :H7 Sakai codait plus de 1600 protéines et 20 ARNt qui ne figurent pas dans la souche non pathogène *E. coli* K12 et la plupart sont les protéines spécifiques de la souche O157 qui sont codées par des prophages et éléments similaires aux prophages (Hayashi *et al.* 2001). Les échanges génétiques via les transferts horizontaux ne concernent pas seulement les gènes de virulence mais également les gènes de résistance aux antibiotiques. Parmi les gènes de résistances aux antibiotiques, nous retrouvons les gènes $bla_{\text{CTX-M}}$. Ces gènes sont souvent portés par des plasmides et sont susceptibles d'être transmis d'une bactérie à l'autre grâce au phénomène de conjugaison.

Dans cette partie consacrée à la bactérie *E. coli*, les différents pathotypes rencontrés chez le porc, les différents mécanismes de transfert de gêne impliqués dans la plasticité du génome d'*E. coli*, les plasmides et la phylogénie d'*E. coli* vont être présentés.

2- Pathogénicité intestinale des *E. coli*

Les souches *E. coli* pathogènes sont classées en fonction des symptômes cliniques qu'elles entrainent. Cette classification regroupe les *E. coli* responsables de pathologies intestinales (IPEC) et les *E. coli* responsables de pathologies extra-intestinales (ExPEC) (Kohler & Dobrindt 2011). Il existe sept catégories d'IPEC chez l'homme, ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, EIEC, DAEC et AIEC (Servin 2014). La caractéristique des souches d'IPEC est la présence de facteurs de virulences jouant un rôle décisif dans la pathogénèse et permet ainsi de les discriminer des souches d'*E. coli* non pathogènes et des ExPEC (Kohler & Dobrindt 2011). La pathogénicité bactérienne résulte d'un processus multifactoriel, impliquant de nombreux gènes qui peuvent être transmis d'une bactérie à l'autre via différents mécanismes de transferts horizontaux.

Chez le porc, les différentes pathologies sont dues à des *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), des *E. coli* entéropathogènes (EPEC), des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) (Zimmerman J. 2012). Les diarrhées et la maladie de l'œdème sont les principaux signes cliniques et peuvent entrainer une morbidité, une perte de poids des animaux voire de la mortalité et engendrent un coût de traitement et de vaccination. Le tableau 1 récapitule les différents pathotypes porcins présentés dans ce mémoire, ainsi que les gènes et les éléments génétiques mobiles intervenant dans leurs pathogénicités.

Tableau 1: Gènes et éléments génétiques mobiles impliqués dans les pathologies porcines

Pathotypes	Nom	gène	Eléments génétiques mobiles	Mécanismes de virulence
ETEC	CF		Plasmide	Adhésion
	AIDA	*Aida*	Plasmide	Adhésion
	LT	*Elt, etx*	Plasmide	Toxine
	ST		Plasmide ou transposon	Toxine
EPEC	Intimine	*eae*	PAI	Adhésion
	TIR	*tir*	PAI	Adhésion
	EspA, EspB et EspD	*espA, espB et espD*	PAI	Adhésion
	Protéine d'ancrage	*sep et esc*	PAI	Adhésion
	Pili de type IV	*PilE*	Plasmide	Adhésion
EHEC	Intimine	*Eae*	PAI	Adhésion
	Fimbriae		Plasmide	Adhésion
	Stx	*Stx*	Phage chromosomique	Toxine
ExPEC	Antigène fimbriae P, S et F1C		PAI	Adhésion

CF : facteur de colonisation ; PAI : îlot de pathogénicité ; ETEC : *E. coli* entérotoxinogène ; EPEC : *E. coli* entéropathogène ; EHEC : *E. coli* entérohémorragique ; ExPEC : *E. coli* responsable de pathologies extra-intestinales

2-1 *E. coli* Entérotoxinogène (ETEC)

Ces souches ont été trouvées la première fois chez le porc et induisaient des diarrhées entrainant la mort des nouveau-nés. Le premier cas chez l'homme a été décrit chez des enfants de moins de cinq ans. Ces souches entrainent des diarrhées aqueuses aigues et avec une rapide déshydratation en quelques heures. Ces bactéries pathogènes sont responsables de millions de cas de diarrhées chaque années et de 300 000 à 500 000 morts par an, particulièrement dans les pays développés (Nataro & Kaper 1998; Fleckenstein *et al.* 2010). Ce pathotype est le plus important chez le porc en entrainant des diarrhées néonatales et après le sevrage (Zimmerman J. 2012).

L'apparition d'une résistance aux antimicrobiens chez les ETEC de porcs est un problème de longue date. Récemment, une tendance à la hausse de souches ETEC avec un phénotype de multi résistance (MDR) a été observée chez les porcs. Une étude réalisée chez le porc en Australie sur la résistance des ETEC a démontré que 92,8% des isolats étaient résistants à un ou plusieurs antibiotiques et 64,3% étaient des MDR. Des résistances à la céfoxitine (14,3%) et à la céphalexine (7.1%) ont été observées (Abraham *et al.* 2014).

Les ETEC colonisent la surface de la muqueuse de l'intestin grêle et élaborent des entérotoxines (ST et/ou LT).

Un groupe protéique hétérogène de structure, dénommé facteurs de colonisations (CF), de structure protéiques hétérogènes, furent les premiers facteurs de virulences à être identifiés dans les infections à ETEC et sont des cibles importantes dans le développement de vaccin. Au moins 25 différents CF ont été décrits et sont codés par des gènes plasmidiques (Fleckenstein *et al.* 2010). La colonisation des cellules est réalisée grâce à des antigènes présents sur les fimbriae jouant un rôle important dans cette étape de colonisation. Les facteurs antigéniques de colonisation F2 (CFA/I), F3 (CFA/II), et CFA/III ont été détectés chez des souches pathogènes d'origine humaine, alors que les facteurs antigéniques de colonisation F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F18, F41, F42 et F165 ont été associés à des souches d'origines animales. Les souches porteuses de l'antigène F4 sont responsables de la plupart des diarrhées sévères chez les nouveau-nés et les porcelets post-sevrages, et induisent une mortalité importante (Xia *et al.* 2015). Différentes protéines de la membrane externe interviennent dans la pathogénicité des ETEC, en augmentant l'adhérence des bactéries aux cellules eucaryotes et/ou la formation de biofilm. Chez l'homme et le porc, ces protéines sont codées par des gènes portés par le plasmide AIDA (pour Adhesin Involved in Diffuse Adherence) (Mainil 2013).

Les toxines Thermolabiles (LT) des *E. coli* sont des oligomères dont la structure et la fonction sont très proche de celles des entérotoxines présentes chez *Vibrio cholerae*. Ces toxines sont sécrétées par un système de sécrétion de type 2 (Mainil 2013) et sont codées par des gènes plasmidiques (*elt* et *etx*). Il existe deux toxines majeures. La toxine LT-I est exprimée chez les *E. coli* pathogènes pour l'homme et pour les animaux. Les toxines LT-II ont été principalement détectées chez des souches d'*E. coli* isolées chez l'animal et rarement chez l'homme. Les toxines LT-I sont des toxines oligomériques de 86 kDa composées d'une sous-unité A de 28 kDa et de cinq sous-unités B identiques de 11,5kDa (Nataro & Kaper 1998). Après liaison des sous-unités B à leurs récepteurs spécifiques (ganglioside GM1) au niveau des cellules hôtes, l'ensemble des toxines LT pénètre par endocytose vers le réticulum endoplasmique de la cellule (Croxen & Finlay 2010).

L'activation de plusieurs voies entraine une augmentation de la perte en électrolytes et en eau à l'origine des symptômes diarrhéiques (Fleckenstein *et al.* 2010).

Les toxines thermostables (ST) sont des toxines monomères constituées de résidus cystéiques, dont les ponts disulfures permettent une stabilité de la toxine à la chaleur. Les gènes *est*A et *est*B (Fekete *et al.* 2012) codant ces toxines sont généralement portés sur des plasmides mais quelquefois ces gènes sont portés par des transposons. Deux types de ST ont été définis. Les toxines STa (aussi appelé ST-I) sont produites par les ETEC mais aussi par d'autres bactéries Gram négative comme *Yersinia enterocolitica* et *Vibrio cholerae* non O1 (Nataro & Kaper 1998). Les toxines STb sont seulement produites par les ETEC impliquées dans les diarrhées néonatales des porcelets. Par contre, les toxines STa et STb sont produites lors d'épisodes diarrhéiques chez les porcs après le sevrage (Zimmerman J. 2012). Ces toxines STb entrainent par activation de plusieurs voies une sécrétion des ions chlorure et une inhibition de l'absorption en NaCl ; ayant pour conséquence une perte d'eau à l'origine de la diarrhée (Fleckenstein *et al.* 2010). D'autres facteurs de virulences interviennent dans les infections à ETEC, l'autotransporteur sérine protéase (EatA) présent chez les *Enterobacteriaceae* clive la cathepsine G et entraine une accumulation de liquide. Une cytotoxine impliquée dans la formation de pores (CylA) peut être également sécrétée et ses fonctions peuvent être similaires à la toxine Sta (Croxen & Finlay 2010).

2-2 *E. coli* Entéropathogène (EPEC)

Les *E. coli* Entéropathogènes (EPEC) sont des pathogènes répandus causant des diarrhées chez les enfants de moins de deux ans dans les pays développés. Au Brésil, au Mexique, en Afrique du sud, en Iran, en Thaïlande et dans d'autres pays développés, les EPEC sont responsables de 5-30% des diarrhées des enfants de cette tranche d'âge. L'antibiothérapie demeure le principal moyen de contrôler l'infection. Cependant, l'utilisation abusive des antibiotiques à large spectre pourrait conduire à une augmentation de la résistance aux antibiotiques. Les β-lactamines sont les antibiotiques les plus couramment administrés chez les patients pédiatriques. De nombreuses études indiquant une augmentation de la résistance aux antibiotiques chez des enfants infectés par un EPEC ont été publiées. En effet, une enquête épidémiologique réalisée dans le sud de la Chine a montré que 60.3% des souches isolées de diarrhée à EPEC étaient porteuses du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ et 27.6% étaient porteuses du gène $bla_{\text{CTX-M-9}}$ (Huang *et al.* 2015). Chez le porc, les infections à EPEC entrainent des diarrhées lors du post-sevrage (Zimmerman J. 2012).

L'infection à EPEC est caractérisée par un effacement des microvillosités et une adhérence entre les bactéries et la membrane cellulaire de l'hôte. Ce phénomène est couramment appelé « attachement et effacement» (A/E) et se décline en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les EPEC adhèrent aux cellules Hep-2 et réalisent des agrégats en formes de faisceaux communément appelés « bundle-forming pili » (BFP). Ces BFP sont codés par le locus *bfp* présent sur le plasmide EAF (Dobrindt 2005). Les pili de type IV sont codés par des gènes présents sur le même plasmide et sont présents à la surface des *E. coli*. Ces pili agissent avec les BFP et stabilisent l'interaction entre les EPEC et les cellules de l'hôte (Croxen & Finlay 2010). Cette adhérence induit par la suite des voies de signal de transduction. Les gènes bactériens impliqués dans le signal de transduction sont situés sur un îlot de pathogénicité appelé locus d'effacement des entérocytes (LEE).

Ce LEE est hautement régulé et présente plusieurs groupes de gènes codant pour un système de sécrétion de type III, de multiples protéines et une adhésine bactérienne appelée intimine (gène *eae*). Le groupe de gène *espA*, *espB* et *espD* code le système de sécrétion de type III et le groupe de gènes *sep* et *esc* code pour une structure d'ancrage dans les membranes bactériennes interne et externe. Le gène *tir* et plusieurs autres gènes codent pour des effecteurs de sécrétion de type 3 à l'intérieur des cellules eucaryotes. La protéine Tir peut avoir différentes fonctions, une fois pénétrée dans le cytoplasme des entérocytes, dont la fonction de récepteur à l'intimine (Mainil 2013). Les protéines EspA, EspB et EspD impliquées dans le système de sécrétion de type III interviennent dans la deuxième étape de l'A/E. En effet, la protéine EspA (25KDa) participe à la formation d'un filament entre la bactérie et la membrane de la cellule de l'hôte. En parallèle, les protéines EspB (38KDa) et EspD (40KDa) entrainent la formation de pores membranaires. La finalisation de l'A/E est induite par l'action de la protéine extra-membranaire, l'intimine codée par le gène *eae*, entraine la formation d'un filament d'actine (Nataro & Kaper 1998; Reis & Horn 2010).

Récemment, des souches DAEC n'exprimant pas les adhésines Afa/Dr et associées à des diarrhées ont été classées dans une sous-classe des EPEC, les EPEC atypiques (aEPEC). Les souches appartenant à cette sous-classe expriment une grande variété de gènes, tels que *aida-1, fimA, ecpA, csgA, elfA, hcpA* et *lda*, lesquels codent pour des facteurs d'adhésions. Par contre, les aEPEC n'expriment pas de BFP, ni de pili de type IV permettant l'interaction entre les bactéries et les cellules de l'hôte chez les autres EPEC (Servin 2014).

2-3 *E. coli* Entérohémorragique (EHEC)

Les infections à EHEC peuvent être asymptomatiques mais peuvent également entrainer des coliques hémorragiques (HC) et un syndrome hémolytique-urémique (SHU). Les cas les plus sévères sont observés chez les enfants de moins de 5 ans, les personnes âgées et les personnes immuno-déficientes (Ho *et al.* 2013). Chez le porc, ces souches sont responsables de la maladie de l'œdème (Zimmerman J. 2012). La multirésistance (MDR) chez les souches EHEC O157 :H7 est un problème de santé publique. En effet, de nombreuses bactéries de la flore intestinale possèdent plusieurs gènes de résistances et pourraient les transférer aux bactéries pathogènes. Plusieurs études ont été réalisées sur la caractérisation des souches EHEC O157 :H7 résistantes aux antibiotiques. Ahmed et *al*. ont réalisé une étude à partir de souches EHEC O157 :H7 isolées à partir de viandes et de produits laitiers en Egypte ; 5.6% des souches récoltées étaient porteuses du gène $bla_{\text{CTX-M}}$ (Ahmed & Shimamoto 2015). Cinq sérotypes dominants d'EHEC sont présents en Europe (O157 :H7 ; O26 :H11, O103 :H2 ; O111 :H8 et O145 :H28), mais il existe un grand nombre de STEC (pour Shiga toxin-producing *E. coli*) plus rarement impliqués dans des cas humains ou des épidémies. Ce fut le cas du sérotypes O104 :H4, responsable de deux épidémies en Allemagne et en France (Brugère *et al.* 2012) L'*E .coli* O157 :H7 est la souche de référence des EHEC et a été la première fois associé à une colique hémorragique en 1983 lors d'une intoxication alimentaire au Etats-Unis. Bien que la souche EHEC O157 :H7 est un pathogène humain responsable d'infection dans le monde, il est également un résident commensal communément trouvé dans le tractus intestinal des ruminants comme les bovins, les moutons, les chèvres et les cerfs.

Certains *E. coli*, particulièrement le sérotype O157 :H7, le sérogroupe O26 et d'autres *E. coli* non-O157 peuvent être présents sporadiquement dans les intestins et les fèces des porcs. Ces souches sont considérées comme zoonotiques (Zimmerman J. 2012).

L'infection à EHEC est caractérisée par un phénomène couramment appelé « attachement-effacement» (A/E) et par la production de toxines, les shigatoxines. Toutes les souches d'*E. coli* possédant un gène *stx* sont appelées *E. coli* producteurs de shigatoxine ou STEC (pour Shiga toxin-producing *E. coli*). Les EHEC constituent un sous-groupe des STEC, ce sont des souches STEC pathogènes pour l'homme (Caprioli *et al.* 2005). Comme chez les EPEC, les EHEC présentent un îlot de pathogénicité appelé locus d'effacement des entérocytes (LEE). Le développement de lésions d'attachement-effacement des entérocytes résulte de l'action combinée de protéines codées par des gènes regroupés dans le LEE. Le gène *eae* est un des principaux gènes conservés au sein du LEE et code pour l'intimine, une protéine de la membrane externe bactérienne impliquée dans l'adhésion étroite de la bactérie à l'entérocyte. Ce gène a été découvert lors d'infection à EPEC (McWilliams & Torres 2014). Les gènes impliqués dans la pathogénicité des EHEC sont similaires à ceux des EPEC, à l'exception de la présence d'un phage chromosomique codant la toxine Stx et la présence d'un plasmide caractéristique des EHEC. Ce plasmide pO157 code pour une hémolysine HLy (*hlyA*) (Bielaszewska *et al.* 2014) et pour un antigène fimbriae augmentant le potentiel de colonisation (Nataro & Kaper 1998).

Les shigatoxines (Stx) ont été la première fois documentées par leur effet sur les cellules « Vero » en 1977. confirmées plus tard en 1983 chez un patient infecté avec la souche EHEC O157 :H7 (Ho *et al.* 2013). La famille des Stx regroupe l'ensemble des toxines présentant une structure similaire et une activité biologique proche. Sur la base de leur différence de toxicité *in vitro* et *in vivo*, de séquence en acides aminés ou de séquence nucléotidique des gènes *stx*, deux grands types de shigatoxines, Stx1 et Stx2 avec de nombreux variants (Stx1a à Stx1c et Stx2a à Stx2g) ont été identifiés (AFSSA 2008). Les gènes *stx* sont portés par des prophages c'est-à-dire des génomes de phages intégrés dans le chromosome des souches EHEC (Herold *et al.* 2004). Les Shiga toxines produites par les EHEC sont similaires à celles retrouvées chez *Shigella dysenteriae*. Les Shiga toxines sont des toxines multimériques, comprenant une sous-unité A de 30 kDa et 'une sous-unité B composée d'un pentamère de 7kDa (chaque). Lors d'une infection, la sous-unité B se lie à des récepteurs à glycosphingolipide globotriosylcéramide (Gb3) présents à la surface des cellules intestinales et à la surface des cellules rénales; induisant une invagination de la membrane facilitant l'action de la toxine. La sous-unité A inhibe la synthèse protéique, provoquant la mort cellulaire (Ho *et al.* 2013). Les souches productrices de toxines Stx2a, Stx2c et/ou Stx2d sont le plus souvent responsables du SHU chez l'homme, alors que les souches productrices de la toxine Stx2e sont souvent associées à la maladie de l' œdème chez le porc (Mainil 2013).

Certains facteurs exogènes, tels que les rayons UV ou des antibiotiques comme la mitomycine C, peuvent déclencher un cycle lytique chez une bactérie lysogène, se traduisant par l'excision de l'ADN du phage hors du chromosome bactérien et par production de particules phagiques pouvant infecter d'autres souches bactériennes. Le cycle lytique conduit ainsi, d'une part, à la perte du phage et donc du gène *stx* par la bactérie porteuse et d'autre part, au transfert (ou « transduction ») de ce dernier vers d'autres bactéries, appelé « conversion lysogénique » (Schmidt *et al.* 1999).

La conversion de souches d'*E. coli* a été démontrée *in vitro* mais aussi *in vivo*, dans le tractus gastro-intestinal de souris, de ruminants ou d'humains (Bielaszewska *et al.* 2007b).

2-4 *E. coli* responsables de pathologies extra-intestinales (ExPEC)

Parmi les *E. coli* responsables de pathologies extra-intestinales, les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* responsables de méningite néonatale (NMEC) et les *E. coli* impliqués dans les septicémies (SEPEC) ont été regroupés dans le groupe des ExPEC. Les ExPEC font partie d'une fraction de la microflore intestinale de la population en bonne santé. Par contre, une fois qu'ils ont accès à une niche extérieure à l'intestin, ils sont en mesure de coloniser efficacement cette niche et de provoquer des maladies chez l'homme et chez les animaux. Chez l'homme, ces ExPEC provoquent des infections des voies urinaires (UTI), des septicémies ou des méningites chez les nouveau-nés (Kohler & Dobrindt 2011). Chez le porc, les ExPEC sont également impliqués dans des infections des voies urinaires non spécifiques (Zimmerman J. 2012).

Contrairement aux infections à ETEC, EPEC et EHEC, les infections à ExPEC ne sont pas caractérisées par un groupe constant de facteurs de virulence. Ils possèdent un large nombre de facteurs de virulences qui varient considérablement entre les souches. Ces souches possèdent souvent des antigènes fimbriae appartenant à la famille P, S et F1C dont les gènes sont portés sur un PAI et impliquées dans la colonisation bactérienne. Elles peuvent également produire des cytotoxines comme une hémolysine et des facteurs cytotoxiques nécrosants (CNF). Un système de capture du fer comme l'aérobactine peut être présent et ainsi permettre aux ExPEC de survivre dans le sang et dans des tissus autres que l'intestin. Les ExPEC présentent des antigènes O présents au niveau des lipopolysaccharides (LPS) et des antigènes K capsulaires, leur permettant une protection contre les phagocytes. Des isolats obtenus à partir de pyélonéphrite chez le porc ont montré qu'ils étaient rarement hémolytiques et ne possédaient pas forcément les fimbriae P et F1C (Zimmerman J. 2012).

2-5 Focus sur la souche *E. coli* TN03

Pour mon projet, la souche *E. coli* TN03 a été utilisée lors d'un protocole expérimental comme souche d'origine humaine résistante aux céphalosporines de troisième génération (R-C3G).

Cette souche d'*E. coli* a été isolée chez un patient souffrant d'une infection urinaire à Paris et appartient au groupe phylogénétique B2 sous-groupe I. Clermont et *al.* ont montré que cette souche appartenait au clone pandémique *E. coli* O25b :H4-ST131 (Clermont *et al.* 2008a). Ce clone a été identifié en 2008 comme un clone majeur dans la dissémination du gène de résistance $bla_{\text{CTX-M-15}}$, le plus répandu en médecine humaine dans le monde. Ce clone est maintenant retrouvé dans la plupart des hôpitaux et des communautés dans le monde entier provoquant des infections extra-intestinales, le plus souvent des infections urinaires et des bactériémies.

Une étude réalisée en 2011 indique que le clone O25b :H4-ST131 est le plus commun dans les hôpitaux allemands, 35,8 % des isolats possédant le gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ appartiennent à ce clone (Pietsch *et al.* 2015). Ce clone a été associé aux *E. coli* uropathogènes (UPEC) (Vimont *et al.* 2012).

Cependant, les résultats MLST des six gènes de ménages, *trpA, trpB, pabB, putP, icd et polB* ont montré que la souche *E. coli* TN03 était étroitement liée à des souches d'*E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) de sérotype O25b (Clermont *et al.* 2008a). Les souches d'*E. coli* ST131 présentent des résistances à plusieurs antibiotiques et par conséquent le choix des traitements est limité et les récidives de l'infection sont fréquentes (Schembri *et al.* 2015). Les résistances les plus répandues pour ce clone sont les résistances aux céphalosporines et/ou aux fluoroquinolones (Johnson *et al.* 2014).

Ce clone a été également retrouvé chez les animaux de compagnies. En 2010, huit pays européens (hors Royaume-Uni) ont confirmé la présence du clone ST131 dans 6% des souches productrices de β-lactamase à spectre étendu (BLSE) isolées chez les animaux de compagnie (Ewers *et al.* 2010). A partir des isolats obtenus entre 2009 et 2012, Timofte *et al.* ont montré pour la première fois au Royaume-Uni la présence de ce clone pandémique chez les chiens (Timofte *et al.* 2014). Une étude a montré la transmission de ce clone entre les animaux domestiques. Cependant, la transmission de l'animal domestique vers l'homme n'a pas été confirmée. La présence de ce clone a également été retrouvée chez d'autres animaux comme les mouettes (Peirano G 2010) et les rats (Ewers *et al.* 2010). Des études espagnoles ont montré une faible prévalence de ce clone dans les élevages de poulets et de porcs (Rogers *et al.* 2011).

La souche *E. coli* TN03 possède de nombreux facteurs de virulence comme des îlots de pathogénicité (Vimont *et al.* 2012). Clermont *et al.* ont montré que cette souche produisait des biofilms, propriété non codée par le plasmide porteur du gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (Clermont *et al.* 2008a). Cette capacité peut contribuer à la persistance de ce clone dans l'environnement et à sa résistance aux antibiotiques et aux désinfectants (Vimont *et al.* 2012). Dans cette même étude, la virulence de cette souche a été établie lors d'expérimentations sur les souris (Clermont *et al.* 2008a). Toujours sur un modèle expérimental sur les souris, Vimont *et al.* ont montré que la souche d'*E. coli* TN03 avait la capacité à s'implanter dans le microbiote intestinal (Vimont *et al.* 2012).

3- Transfert horizontal de gènes et éléments génétiques mobiles

Le transfert horizontal de gènes a un énorme impact sur la plasticité du génome, l'adaptation et l'évolution de la bactérie. Le transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles est impliqué dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques et des gènes de virulence, contribuant donc à l'émergence de nouvelles « superbactéries » (Juhas 2015). L'analyse des séquences de génomes *d'E. coli* a montré une grande variabilité dans l'organisation et la taille des génomes. La comparaison des séquences génomiques d'*E. coli* pathogènes et d'*E. coli* non pathogènes a montré que le chromosome bactérien représentait environ 4,1 Mb mais qu'il était interrompu par des régions d'ADN mobiles spécifiques impliqués dans la virulence.

Plusieurs de ces régions génomiques présentes chez les *E. coli* pathogènes sont représentése par des îlots de pathogénicité (PAI) (Hacker *et al.* 2004) et par d'autres éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les transposons, séquences d'insertion (IS), bactériophages (Kelly *et al.* 2009) et contribuent à la plasticité des génomes (Ravi *et al.* 2014). Ces éléments peuvent être transmis vers d'autres bactéries par différents mécanismes de transfert horizontal.

3-1 Transfert horizontal de gènes

Ces éléments mobiles génétiques peuvent être transférés vers d'autres bactéries par trois méthodes : la conjugaison, la transduction et la transformation (Gyles & Boerlin 2014). La figure I représente les différents mécanismes de transfert d'ADN au sein des bactéries.

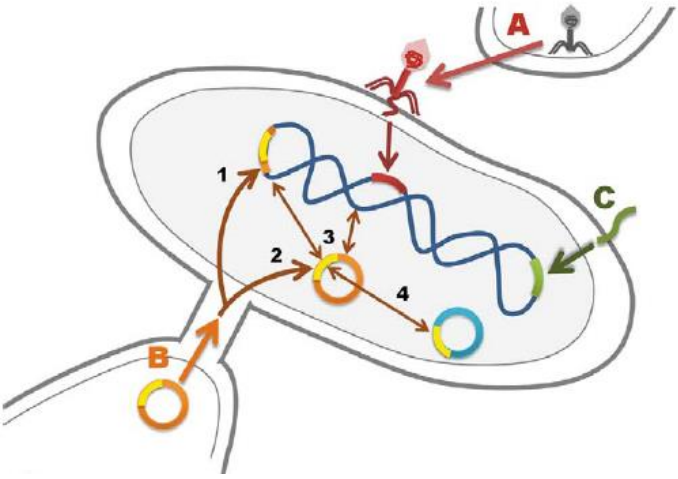


Figure I : Mécanismes de transfert de l'ADN au sein des bactéries (Gyles & Boerlin 2014)

(A) Transduction : injection d'ADN dans la bactérie via un phage. (B) Conjugaison : transfert d'un plasmide d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse via un pili ; le plasmide peut être intégré dans le chromosome (1) ou dans le cytoplasme (2) de la bactérie receveuse; le plasmide peut échanger des séquences d'insertion ou des transposons avec d'autres plasmides ou le chromosome de la bactérie receveuse. (C) transformation : Intégration d'ADN nu provenant de l'environnement.

Le transfert par conjugaison est médié par certains plasmides conjugatifs ou certains éléments d'intégration conjugatifs avec des gènes de transfert spécifiques. La conjugaison nécessite un contact cellules à cellules et la présence de gêne intervenant dans le processus de transfert. De nombreux plasmides ne sont pas conjugatifs, mais peuvent être transmis d'une bactérie à l'autre grâce à un plasmide « helper »et à l'utilisation de protéines de mobilisation (Kelly *et al.* 2009).

La transduction est un procédé dans lequel un virus spécifique des bactéries, appelé bactériophage ou phage transfère son ADN dans la bactérie. Le phage s'insère dans le chromosome de la bactérie et utilise la machinerie de l'hôte pour répliquer son propre ADN (Gyles & Boerlin 2014). Deux types bactériophages existent en fonction de leur cycle de vie.

Les bactériophages lytiques infectent la bactérie et produisent plus de bactériophages en même temps que la lyse de la cellule bactérienne hôte. Les bactériophages lysogéniques, aussi appelés prophages, sont capables d'intégrer le chromosome bactérien et donc de faire partie de la composition génétique de la bactérie. Un cycle lytique peut débuter chez les prophages sous certaines conditions comme l'utilisation d'antibiotiques (Kelly *et al.* 2009). Dans ce cas, les gènes présents sur l'ADN phagique comme des gènes de virulences peuvent être exprimés à haut niveau.

Dans de rare cas, une partie de l'ADN bactérien peut être intégrée dans l'ADN du phage et ainsi être transmis lors d'un autre cycle d'infection. Ce processus est appelé transduction généralisée et n'importe quelle région du chromosome bactérien peut être transférée (Gyles & Boerlin 2014).

La transformation consiste en l'absorption d'ADN nu de l'environnement par des bactéries, qui sont dans un état physiologiques favorable à ce processus. Le passage de l'ADN simple brin à travers la membrane bactérienne nécessite un procédé énergétique complexe, puis l'ADN entre dans le chromosome bactérien principalement par des recombinaisons homologues mais aussi par des mécanismes de recombinaison non homologue codé par l'ADN étranger. Ce mécanisme permet le transfert d'ADN entre bactéries faiblement apparentées. Quelques espèces bactériennes ou souches au sein d'une espèce bactérienne sont plus enclines que d'autres à être naturellement compétentes pour l'ADN étranger (Gyles & Boerlin 2014).

3-2 Eléments génétiques mobiles

Les éléments génétiques mobiles incluant les plasmides, les bactériophages, les îlots génomiques, les intégrons, les transposons et les séquences d'insertion jouent un rôle majeur dans la plasticité des génomes d'*E. coli* (Kelly et *al*. 2009). A titre d'exemple, le génome de la souche *E. coli* K12 est de 4,64 Mb, alors que le génome de la souche *E. coli* sakai appartenant au pathotype EHEC est 5,59 Mb (Dobrindt 2005)

Comme mentionné plus tôt, les bactériophages permettent le transfert d'ADN via le processus de transduction. Un grand nombre de toxines bactériennes ont été trouvées dans le génome des phages qui ont été incorporé dans le chromosome bactérien (Gyles & Boerlin 2014). Il a été montré que les gènes codant les shigatoxines, *stx*1 et *stx*2 sont transférables d'une souche d'*E. coli* à une autre souche via des bactériophages (Brabban *et al.* 2005). L'analyse des séquences des génomes a indiqué un haut pourcentage (environ 85%) de variabilité du gène présent chez les bactériophages, indiquant que les phages jouaient un rôle dominant dans la diversification des souches *E. coli* O157 et aussi dans l'évolution des souches *E. coli* O157 : H7. La transduction des gènes *stx* par les phages à d'autres *E. coli* entériques peut contribuer à l'hétérogénéité détectée dans les sérotypes STEC. En effet, plus de 400 sérotypes O : H ont été découverts chez les animaux, dans les aliments et lors d'infection chez l'homme (Kelly *et al.* 2009).

Les intégrons sont des éléments d'ADN possédant une cassette de gènes. Ils sont composés de gènes codant des intégrases, des cassettes de gènes et d'un site d'insertion pour les cassettes de gènes.

Les intégrons sont généralement non mobiles et sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles comme les transposons et les plasmides, fournissant le promoteur nécessaire à l'expression des gènes présent sur la cassette (Kelly *et al.* 2009). Cinq classes d'intégrons ont été définies en fonction de leur similarité de séquence.

Les intégrons de classe I sont présents chez de nombreux genres ou espèces associés au microbiote intestinal comme *Acinetobacter*, *E. coli* et *Salmonella*. Les cassettes de gènes présents dans les intégrons sont principalement des gènes de résistances aux antibiotiques (Ravi *et al.* 2014).

Une récente étude a démontré que la plupart des intégrons séquencés et caractérisés contiennent au moins un gène de résistance acquis (Fluit & Schmitz 2004).

L'étude de Zhao et *al.* a signalé la présence d'intégrons de classe I conférant un phénotype de résistance chez des souches EHEC dont les sérotypes O157 : H7et non-O157 isolées les bovins, le bœuf haché et chez l'homme (Zhao *et al.* 2001). Les intégrons de classe I situés sur des plasmides ont facilité l'émergence et la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques parmi les STEC chez l'homme et les animaux d'élevage (Kelly *et al.* 2009).

Les transposons sont des séquences d'ADN considérées comme des « gènes sauteurs » car ils ont la capacité de changer de leurs positions génétiques, grâce à la présence d'un gène codant pour une transposase (Kelly *et al.* 2009). Ils peuvent être présents sur les chromosomes et les plasmides, et, en plus de leur fonction de transposition, ils portent d'autres gènes, tels que les gènes de résistance aux médicaments et de virulence. Ces éléments sont impliqués dans des mouvements d'ADN au sein même de la bactérie mais peuvent toutefois être transmis à d'autres bactéries par le transfert d'ADN plasmidique ou chromosomique (Gyles & Boerlin 2014).

Les séquences d'insertion (IS) sont des petits fragments d'ADN simple avec une simple organisation. Typiquement une IS se compose d'un cadre de lecture ouvert qui code pour une transposase, et de séquences inversées répétées présentes aux extrémités; permettant la coupure de l'ADN et l'insertion de l'IS. Ces éléments peuvent s'insérer dans les plasmides et le chromosome. L'insertion d'IS est mutagène ; il peut provoquer la suppression ou la sur-régulation des gènes adjacents (Gyles & Boerlin 2014). A partir des souches EHEC isolées chez les bovins, Robinson et *al.* ont montré que la présence d'un IS pouvait dans certains cas inactiver le gène *stx* et entrainer une faible ou une absence de production de la toxine Stx (Robinson *et al.* 2006). Une recombinaison homologue peut également se produire lorsque plusieurs copies d'IS sont présentes sur le chromosome ou un plasmide, avec une variété d'effets, tels des délétions, des inversions et des duplications. Ochi et *al.* ont montré que les gènes codant les entérotoxines LT et STa étaient présents sur un plasmide dans lequel ces gènes étaient séparés par 13,5 kb d'ADN et entourés par quatre IS, dont trois identiques. Les auteurs ont suggéré que ces gènes codant ces entérotoxines pouvaient être mobilisés dans le plasmide grâce aux IS (Ochi *et al.* 2009).

Les îlots génomiques sont des larges segments d'ADN étranger insérés dans le chromosome bactérien, généralement à proximité du gène codant l'ARNt. Ces îlots peuvent être retrouvés sur des plasmides. Aux extrémités de ces régions d'ADN, des séquences répétées ou des IS peuvent être présentes avec généralement des gènes de mobilités comme des intégrases ou des transposases. Certaines bactéries peuvent être exemptes de ces régions. Les îlots génomiques peuvent porter des gènes de virulences et sont alors appelés îlot de pathogénicité (PAI).

Les mécanismes de transfert de ces PAI sont multiples et incluent la conjugaison, la transduction et aussi la transformation (Gyles & Boerlin 2014). Le PAI impliqué dans les infections à EHEC et EPEC est le LEE localisé au niveau du chromosome. Une étude réalisée sur plusieurs souches EHEC et EPEC a montré que le site d'insertion du LEE variait pour différentes souches chez un même pathotype.

Cette même étude a reporté que l'organisation génétique du LEE du sérotype O127 :H7 (EHEC) était similaire au sérotype O127 :H6 (EPEC).

Les différentes localisations des LEE chez les différentes lignées phylogénétiques des EHEC suggèrent que l'insertion des LEE a été multiple dans le temps au cours de l'évolution des EHEC et des EPEC (Wieler *et al.* 1997). Certains îlots génomiques codent des adhésines telles que les fimbriae F, S et F1C qui sont produites par des souches commensales du tractus intestinal. Et lorsque ces souches possédant ces adhésines deviennent pathogènes et responsables d'infections urinaires, alors ces îlots deviennent des îlots de pathogénicité (Hacker & Carniel 2001).

4- Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN double brin circulaire dont la réplication est autonome (Couturier *et al.* 1988). Lors de leur réplication, il existe des mécanismes permettant de contrôler le nombre de copies par cellule fille (système de partition) ainsi que la stabilité de la transmission (Carattoli 2009). Les plasmides contiennent des gènes qui sont utiles non seulement pour eux-mêmes (réplication, conjugaison), mais aussi pour leur hôte bactérien. Par exemple, les gènes peuvent coder pour la résistance aux antibiotiques, la dégradation de composés organiques et les facteurs de virulence, dont la production de toxines (Couturier *et al.* 1988). Des gènes et des opérons sont impliqués dans la réplication autonome et la régulation de la réplication plasmidique. Pour cela, les plasmides contiennent généralement une origine de réplication (ori) (quelques plasmides peuvent avoir deux ou trois origines de réplication) (Nordstrom 2006), les gènes *cop* et *inc* sont impliqués dans le contrôle et l'initiation de la réplication et les gènes *rep* codent pour des protéines également impliquées dans la réplication et ses contrôles (Couturier *et al.* 1988).

Les plasmides peuvent être auto-transmissibles (ou conjugatifs), ce qui signifie qu'ils codent les protéines nécessaires pour la conjugaison ou ils peuvent être non auto-transmissibles (non conjugatifs), quand les protéines nécessaires à la mobilisation doivent être fournies (Kelly *et al.* 2009). Le transfert horizontal des plasmides non conjugatifs a été montré chez *E. coli* et interviennent dans la dans la formation de biofilm (Maeda *et al.* 2006).Il a été montré que des gènes de virulences et des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être situés sur un même plasmide. L'un des plasmides d'une souche isolée d'une infection à ETEC lors d'un épisode de diarrhée post-sevrage chez le porc portait à la fois les gènes codant les toxines ST et le gène *tetB* responsable de la résistance à la tétracycline (Fekete *et al.* 2012).

En 1971, Hedges et Datta ont proposé une classification des plasmides qui est basée sur la stabilité du plasmide au cours de la conjugaison. Ce phénomène est appelé l'incompatibilité du plasmide.

L'incompatibilité a été définie comme l'incapacité de deux plasmides apparentés à se propager de façon stable dans la même cellule ; ainsi, seuls les plasmides compatibles peuvent être maintenus dans les transconjugants. Cette incompatibilité est liée aux mécanismes de réplication et de partition qui sont communs aux deux plasmides. Le premier groupe d'incompatibilité (Inc) a été alors défini. Il existe actuellement 27 groupes Inc reconnus chez les *Enterobacteriaceae* par le « Plasmid Section of the National Collection of Type Culture » (Carattoli 2009).

En 1988, Couturier et ses collègues ont développé une nouvelle méthode permettant l'identification de la plupart des réplicons plasmidiques des *Enterobacteriaceae* (Couturier *et al*. 1988). Cette méthode est basée sur l'hybridation en utilisant 19 sondes reconnaissant les différents réplicons.

En 1996, Gotz *et al.* ont mis au point une PCR permettant la détection des groupes plasmidiques IncP, IncN, IncW et IncQ (Gotz *et al.* 1996). En 2005, une PCR a été développée pour le typage des réplicons basé sur les gènes *inc*/*rep* par Carattoli et ses collègues. Cette technique permet d'identifier les 18 principaux groupes de plasmides d'incompatibilité (FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iγ, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F et FIIA) présents chez les *Enterobacteriaceae* (Carattoli *et al.* 2005). Plus récemment, des nouveaux groupes plasmidiques d'incompatibilité ont été découverts grâce au séquençage à haut débit, augmentant l'identification des réplicons par PCR à 25 (Villa *et al.* 2010; Johnson *et al.* 2012). Dernièrement, les outils PlasmidFinder et pMLST (www.genomicepidemiology.org) ont été développés pour la caractérisation des séquences plasmidiques (Carattoli *et al.* 2014).

5- Classification phylogénétique

L'étude la diversité d'*E. coli* commence bien avant la disponibilité des données moléculaires. Les souches étaient classées en fonction de leurs sérotypes, de leurs profils métaboliques et par l'illustration de la diversité génomique par l'hybridation de l'ADN (Chaudhuri & Henderson 2012). Le sérotypage d'*E. coli* est basé sur la recherche des antigènes de surface somatique (O), flagellaire (H) et capsulaire (K). Plus de 180 antigènes O, 60 antigènes H et 80 antigènes K ont été décrits. Le sérotype d'une souche est souvent décrit par la combinaison de l'antigène O et H. Un pathotype peut comprendre plusieurs sérogroupes et un sérogroupe peut être présent chez plusieurs pathotypes et même chez des *E. coli* non pathogènes (Stenutz *et al.* 2006).

Par la suite, l'étude de Milkman a conduit à utiliser la technique « multi locus enzyme electrophoresis » (MLEE) comme technique commune pour l'étude de la diversité bactérienne. Selander et Levin ont donc utilisé cette technique pour la diversité génétique d'*E. coli*. Leurs résultats ont permis d'observer un profil électrophorétique semblable à partir d'isolats indépendants, indiquant un taux de recombinaison peu fréquent. Différentes études réalisées par la suite ont soutenu l'hypothèse que les populations d'*E. coli* évoluent de manière clonale, avec des recombinaisons limitées. Ces différentes études ont donc montré l'absence de corrélation entre le sérotype et la diversité génomique ; des souches génétiquement distinctes peuvent appartenir au même sérotype (Chaudhuri & Henderson 2012). Cette technique MLEE est basée sur le principe que les mutations codant pour des enzymes métaboliques bactériennes peuvent être détectées par migration électrophorétique des enzymes. Des travaux ont été publiés sur l'utilisation de cette technique comme outil permettant l'étude de la diversité clonale et génétique pour de nombreux agents pathogènes bactériens (Ashton 1990).

A partir d'une collection de souches d'*E. coli* connues (ECOR), cette technique a permis de mettre en évidence les groupes phylogénétiques A, B1, B2, D et un groupe plus mineur, le groupe E qui a été largement ignoré car il donnait des résultats incohérents (Ochman & Selander 1984).

Cette collection est composée de 72 souches d'*E. coli* d'origines humaines et de 16 d'origines animales, représentées par des souches commensales et des souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC). Cette collection ne présente pas de souches provoquant des IPEC (Chaudhuri & Henderson 2012).

A partir des années 2000, les données sur les séquences nucléotidiques ont permis l'utilisation de la technique « Multi-Locus Sequence Typing » (MLST). Cette technique consiste à obtenir des séquences nucléotidiques d'environ 450 pb dérivant de 6 à 8 gènes de ménages distincts du chromosome bactérien (Chaudhuri & Henderson 2012). Wirth et *al*. ont séquencé les gènes de ménages *adk, fumC, gyrB, icd, mdh, recA* et *purA* de 462 souches incluant des pathogènes d'origines humaines et animales, de la collection ECOR, des isolats provenant de mammifères sains australiens représentant la diversité connu d'*E. coli*, des isolats provenant de patients atteints de diarrhées au Ghana, de *Shigella* et des isolats exprimant le polysaccharide capsulaire K1. Cette étude a été réalisée dans le but d'estimer la structure de la population d'*E. coli* et de démontrer que la recombinaison est largement répandue au sein de cette espèce. Une analyse des polymorphismes dans les sept gènes a été réalisée avec le logiciel STRUCTURE, qui emploie la méthode bayésienne permettant ainsi de discerner les groupements parmi les organismes recombinants. Cette analyse a permis de reconnaître les quatre groupes phylogénétiques ancestraux de polymorphisme, A, B1, B2 et D. Cependant, de nombreuses souches ont été classées dans des groupes hybrides (AxB1 et ABD) qui contiennent une ascendance significative de plusieurs sources. Les résultats des souches de la collection ECOR concordent avec les résultats obtenus avec la technique de MLEE. Le groupe hybride AxB1 contient des souches qui sont pour la plupart des ancêtres des groupes phylogénétiques A et B1. Le deuxième groupe ABD regroupe des isolats des hétérogènes issus de diverses sources. Les résultats ont indiqué que la recombinaison homologue a été si fréquente que le tiers des isolats, et une proportion plus élevée pour les souches pathogènes, étaient affectés aux groupes hybrides AxB1 et ABD. La recombinaison par le biais de mutations a été encore plus importante chez les isolats appartenant aux groupes B1, B2 et D. Par la suite, les auteurs ont étudié la répartition des différents groupes phylogénétiques A, B1, B2, D AxB1 et ABD en fonction du degré de partage allélique (Wirth *et al.* 2006). L'arbre MS_{TREE} de la figure II représente la répartition de ces différents groupes phylogénétiques.

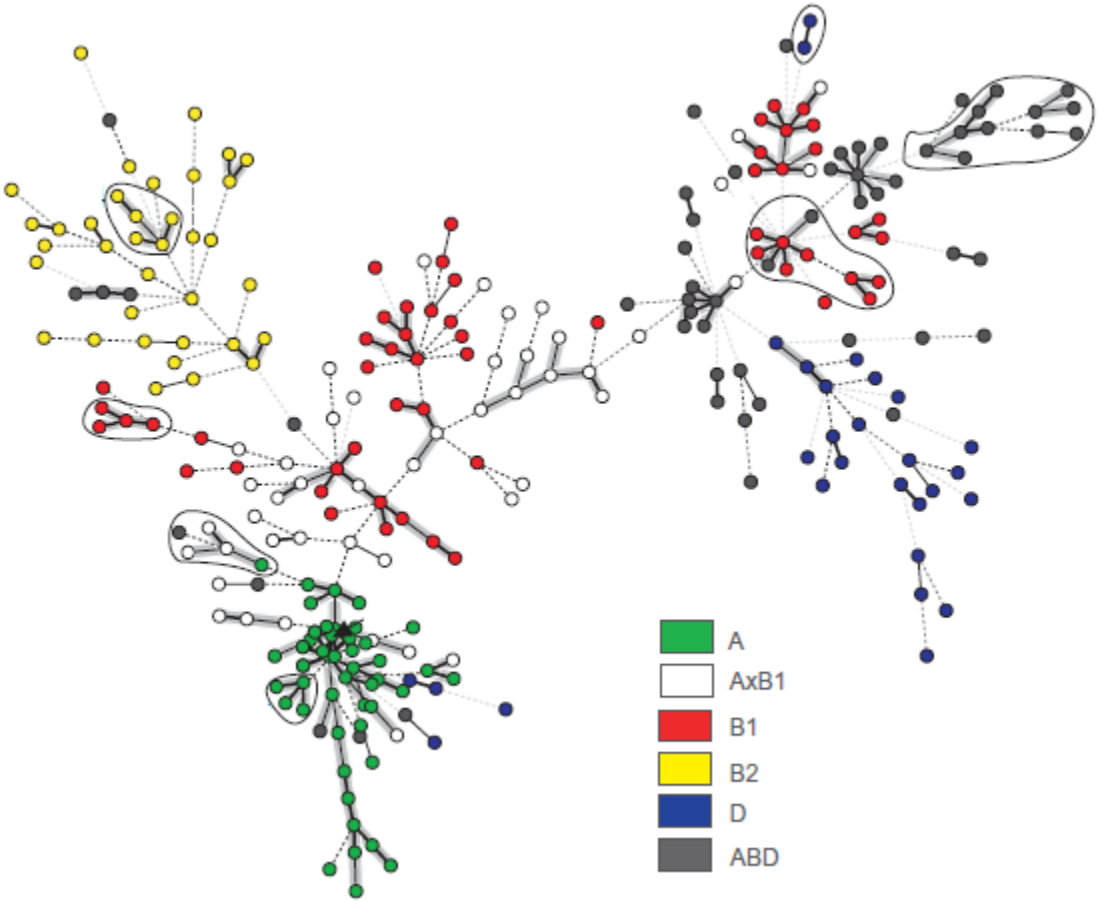


Figure II : Distribution des groupes phylogénétiques A, B1, B2, D, AxB1 et ABD dans un arbre minimal couvrant (MS_{TREE}) des 275 ST d'*E. coli* en fonction du degré de partage allélique.

Les points sont colorés en fonction du groupe phylogénétique et les lignes de connexions des ST complexes (STc) sont marquées en gris.

Pour déterminer la distribution des différents groupes phylogénétiques, une analyse des différentes séquences obtenues par MLST a été réalisée et a permis d'obtenir des séquences types (ST) pour chaque unique combinaison allélique. Pour cette étude, les auteurs ont utilisé des souches isolées lors d'infections à EHEC, EIEC, EPEC, des isolats exprimant le polysaccharide capsulaire K1, des *Shigella*, d'autres souches pathogènes et des souches non pathogènes. A partir des 275 ST attribués, des groupes de ST ont été établis en utilisant les principes de l'algorithme eBurst, et sont appelés ST complexe (STc). Les STc regroupent des individus qui ont au maximum deux allèles différents. Les ST ne correspondant pas aux critères d'inclusion au sein d'un STc sont tout simplement appelés ST. La construction de l'arbre MS_{TREE} a été réalisée avec le logiciel BioNumerics V3.5 et a permis de relier les différents ST obtenus avec la base de données MLST. La relation entre les allèles présentés dans l'arbre MS_{TREE} corrèle fortement les résultats obtenus avec le logiciel STRUCTURE. Les STc ont été assignés aux différents groupes phylogénétiques A, B1, B2, ou D. La quasi-totalité du groupe A dont la majorité des souches étaient non pathogènes, correspond au STc 10, indiquant un taux de recombinaison faible. Tandis que les autres groupes B1, B2 et D ont été assignés à plusieurs STc ou ST.

Les ST contenant les isolats appartenant aux groupes hybrides ont été répartis au centre de l'arbre, entremêlés parmi les souches A et B1, montrant ainsi un taux de recombinaison plus important. Les souches appartenant au groupe hybride ABD ont été distribuées dans tout l'arbre indiquant aussi un taux de recombinaison important. La proportion de souches pathogènes est plus importante dans les groupes B1, B2 et D et encore plus dans les deux groupes hybrides. Les auteurs ont donc suggéré un lien entre la recombinaison homologue et la virulence. Les *E. coli* commensaux maintiennent une basse fréquence de recombinaison ; mais peuvent parfois acquérir des gènes de virulences par le biais de transfert horizontaux et ainsi être exposés à une sélection encore plus forte des défenses immunitaires de l'hôte, entrainant un taux de mutation et de recombinaison plus élevés (Wirth *et al.* 2006).

Dans les années 2000, Clermont et ses collègues ont mis au point une méthode par PCR permettant la détermination des groupes phylogénétiques; basée sur la détection des gènes *chu*A, *yja*A et d'un fragment d'ADN TSPE4.C2. Sur la base de la présence ou l'absence de ces trois fragments, une souche d'*E. coli* peut être assignée à un des quatre principaux groupes (A, B1, B2 et D). Le gène *chu*A intervient dans le transport de l'hème chez la souche *E. coli* O157 :H7 entérohémorragique, ce gène est présent chez les souches appartenant aux groupes B2 et D, et absent chez les souches du groupe B1 et A. Le gène *yja*A a été initialement identifié dans la séquence complète du génome de la souche *E. coli* K12, mais sa fonction est inconnue. Ce gène est présent chez les souches appartenant au groupe phylogénétique B2 et absent chez les souches du groupe D (Clermont *et al.* 2000). La fonction du fragment d'ADN TSPE4.C2 serait une lipase estérase présente chez les souches du groupe B1 et absente chez les souches du groupe A (Clermont *et al.* 2000; Clermont *et al.* 2013). Cette technique de typage est rapide, peu coûteuse et 95 % des isolats d'*E. coli* sont correctement assignés. En 2013, ces auteurs ont modifié la méthode permettant l'assignation des souches aux groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D pour permettre également la détermination des autres phylogroupes (C, E, F). Pour cela, le gène *arpA* a été choisi comme cible. Ce gène est présent chez tous les *E. coli* sauf chez les souches appartenant aux phylogroupes B2 et F. (Clermont *et al.* 2000; Clermont *et al.* 2013). Ce même gène a été utilisé pour la détermination du groupe E, en développant des amorces spécifiques de l'allèle de ce groupe. La détermination du groupe C a été réalisée grâce à des amorces spécifiques de l'allèle de ce groupe pour le gène *trpA* (Lescat et *al.* 2013).

Les caractéristiques (niches écologiques, capacité à engendrer des maladies et quelques caractéristiques comme l'utilisation de différentes sources de sucres, profils d'antibiorésistance et taux de croissance) des souches appartenant à différents groupes phylogénétiques peuvent être variables (Gordon *et al.* 2008; Carlos *et al.* 2010; Clermont *et al.* 2013). Ainsi les souches d'*E. coli* capables de résister dans l'environnement appartiennent préferentiellement au groupe phylogénétique B1 (Carlos *et al.* 2010). De plus, la taille du génome intervient dans la diversité des groupes, les souches des groupes A et B1 ont un plus petit génome comparé aux souches des groupes B2 ou D (Gordon *et al.* 2008). Les *E. coli* responsables de pathologies extra-intestinales humaines appartiennent généralement aux groupes B2 et D, les souches commensales sont regroupées dans les groupes A et B1, tandis que les pathogènes intestinaux appartiennent aux groupes A, B1 et D (Carlos *et al.* 2010). Des études ont permis d'observer que la distribution des groupes phylogénétiques des *E. coli* dépendait du régime alimentaire de l'hôte, de la masse corporelle et du climat (Gordon & Cowling 2003).

L'analyse de matières fécales d'oiseaux, de mammifères et d'hommes a mis en évidence une prévalence plus élevée des groupes D et B1 chez les oiseaux, A et B1 chez les mammifères et A et B2 chez l'homme (Carlos *et al.* 2010).

II- Le microbiote intestinal porcin

L'intestin des mammifères contient environ 10^{14} cellules bactériennes dont 500 à 1000 espèces, majoritairement anaérobies. Le microbiote intestinal porcin n'est pas homogène, en effet il diffère en fonction de la localisation, avec une diversité et une concentration microbienne significativement plus élevée dans le colon (10^{10} à 10^{12} UCF/g), que dans l'iléon (10^{8} à 10^{9} UFC/g) et que l'intestin grêle (10^{3}à 10^{5} UFC/g) (figure V) (Holman & Chenier 2015). Au plan microbiologique, le tube digestif est colonisé au moment de la naissance et sa flore va évoluer d'une communauté simple et instable à une autre plus complexe mais aussi plus stable. Au moment du sevrage, des changements majeurs interviennent dans la composition de la flore du porcelet, sous l'influence de l'alimentation et de l'environnement. Quelques jours après la naissance, les coliformes et les streptocoques dominent la flore digestive. Les bactéries anaérobies apparaissent plus tard ; les clostridies et les lactobacilles sont aussi présents chez la plupart des hôtes pendant une courte période (figure III) (Lallès JP. 2004).

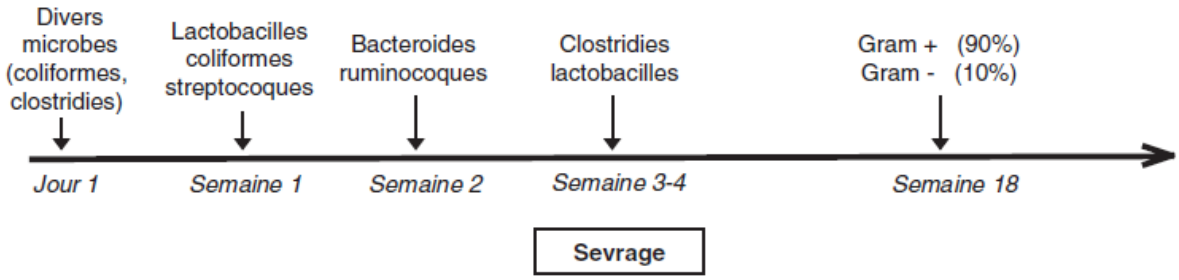


Figure III: Succession temporelle des genres bactériens dans les fécès de porc (Lallès JP. 2004)

Une étude réalisée en 2016 a montré que le genre *Clostridium* était le principal genre L'épithélium intestinal est séparé de la lumière par une couche de mucus épais dont la composition microbienne diffère. A titre d'exemple, les entérobactéries sont retrouvées essentiellement dans la lumière du tube digestif (Sekirov *et al.* 2010) (figure III).

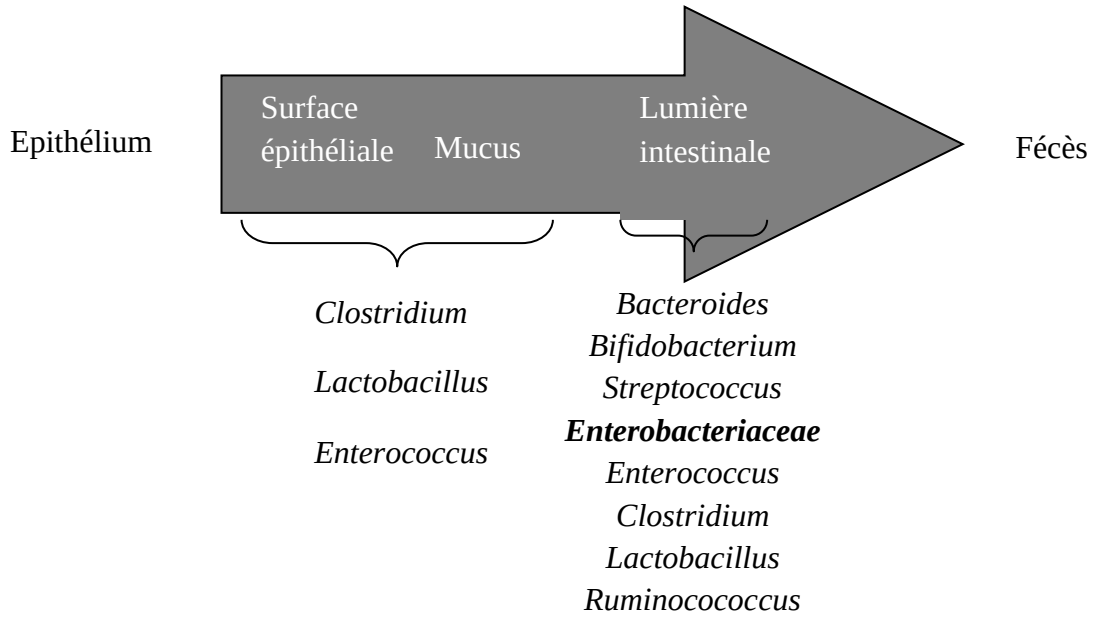


Figure IV: Variation du microbiote intestinal en fonction de la situation dans l'intestin (Sekirov et al. 2010)

III- Les probiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes vivants (bactéries ou levures) qui, ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé en améliorant l'équilibre de la flore intestinale (FAO/WHO 2001). Les principales propriétés des probiotiques sont spécifiques à la souche. Le choix du probiotique se fait selon certains critères dont la résistance à l'acidité et à la bile, leur capacité d'adhérer aux cellules intestinales, leur propriété colonisatrice du microbiote et le profil de résistance aux antibiotiques. L'efficacité et la sécurité doivent être démontrées pour une utilisation dans des procédés industriels (Hou *et al.* 2015). Certains probiotiques ont été sélectionnés pour lutter contres différents troubles gastro-intestinaux chez l'homme. Par exemple, les bactéries lactique sont régulièrement utilisées contre des maladies inflammatoires de l'intestin (Kenny *et al.* 2011). Chez les animaux de rente, les probiotiques permettent d'améliorer la croissance et l'efficacité de l'utilisation des aliments, de stimuler le système immunitaire et de protéger le tractus gastro-intestinal de l'hôte des maladies. Depuis quelques années, de nombreuses souches de probiotiques ont été utilisées dans la production porcine. Les probiotiques ont donc été proposés comme alternative aux antibiotiques puisqu'ils stabilisent les différentes populations du microbiote intestinal et limitent l'implantation des bactéries pathogènes opportunistes (Hou *et al.* 2015). Une étude récente a montré que l'utilisation de *Megasphaera elsdenii* permettrait de retarder la colonisation de bactéries résistantes aux antibiotiques chez le porc (Stanton & Humphrey 2011). Dans ce rapport, les deux souches *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle 1917 utilisées comme probiotiques lors de nos différents essais expérimentaux vont être présentées.

1- *E. coli* ED1a

La souche *E. coli* ED1a appartient au sérotype O81 et au groupe phylogénétique B2 sous-groupe VIII. Ce clone a été détecté dans le microbiote intestinal des personnes en bonne santé vivant en Afrique, en Europe, en Amérique du Sud et rarement dans chez des patients souffrant de maladie intestinale. Il a été montré que ce clone est un bon colonisateur, non virulent, compétitivement dominant par rapport aux autres membres du groupe phylogénétique B2 et est présent pendant une longue période chez l'homme (Clermont *et al.* 2008b). Clermont et *al.* ont montré que cette souche ne possédait pas les gènes classiquement associés à la virulence intra-intestinale (Clermont *et al.* 2008b). Une augmentation de la détection de cette souche a été observée depuis ces 20 dernières années. L'analyse des séquences de souches des clones B2VIII/O81 montre qu'elles sont très homogènes alors que les séquences de souches appartenant au groupe B2 sont polymorphes. Cette observation confirmerait l'idée que ce clone fait l'objet d'une expansion récente (Clermont *et al.* 2008b).

2- *E. coli* Nissle 1917

Le probiotique *E. coli* Nissle 1917 appartient au sérotype O6:K5 :H1 et a été isolée par Alfred Nissle pendant la premières guerre mondiale lors d'une épidémie de gastroentérite, à partir d'un patient sain. Ce clone est utilisé depuis 1920 contre les maladies intestinales chez l'homme (Barth *et al.* 2009). Dans un premier temps, il a été utilisé en médecine humaine en thérapeutique et aussi dans la prévention des maladies infectieuses intestinales.
Peu à peu, le rôle positif de ce probiotique a été prouvé dans des maladies inflammatoires de l'intestin chez l'homme (colite ulcéreuse, maladie de Crohn), dans le traitement et la prévention d'entérite infectieuse, dans l'amélioration de l'immunité chez les nouveau-nés et les nourrissons prématurés. Ensuite, ce probiotique a été utilisé pour prévenir les maladies infectieuses expérimentales ou naturelles chez les animaux, d'abord chez les souris, puis les bovins (Smajs *et al.* 2012). Des données expérimentales ont montré que ce clone avait également des propriétés bénéfiques contres des infections intestinales chez le porc et depuis 2006 ce probiotique est donc utilisé chez les porcs (Barth *et al.* 2009; Smajs *et al.* 2012). L'administration de ce clone s'accompagne de plusieurs propriétés ou conséquences contribuant à son activité chez des animaux :

- Sécrétion de microcines H47 et M inhibant la croissance des autres microorganismes.
- Adhésion aux cellules intestinales porcines et humaines grâce à un fimbriae F1C et à la création d'un réseau de flagelles H1 à la surface des cellules de l'hôte.
- Absence d'altération de la barrière intestinale lors de la première semaine de vie des porcelets.
- Absence de réponse inflammatoire du porcelet.
- Absence de production d'exotoxines et d'entérotoxines.

Des études ont montré que ce probiotique persistait au moins trente-deux jours après le début du traitement dans la flore intestinale porcine (Barth *et al.* 2009). La comparaison génomique et de l'organisation génétique de l'îlot génomique entre la souche *E. coli* Nissle et une souche uropathogène *E. coli* CFT073 a montré que les GEI étaient étroitement liés.

Bien que les structures génétiques globaux des GEI sont similaires, des différences importantes existent et sont responsable de la nature non pathogène de la souche *E. coli* Nissle, alors que la souche *E. coli* CFT073 est uropathogène. Le PAI associé à la souche *E. coli* CFT073 porte les gènes *hly* et *pap* codant pour des facteurs de virulences importants comme une hémolysine et un fimbriae P. Seul l'opéron *pap* fragmenté est présent sur le GEI de la souche *E. coli* Nissle associé à des éléments type transposons. Au cours de l'évolution, le gène *pap* présent sur GEI de la souche *E. coli* Nissle a été perturbé et partiellement supprimé en raison de l'insertion d'IS1 et IS10 et par des évènements de recombinaison consécutifs. Ces évènements ont provoqué l'inactivation du fimbriae P et de l'hémolysine, réduisant ainsi la capacité de virulence hypothétique de la souche *E. coli* Nissle (Dobrindt 2005).

IV- Les antibiotiques

1- Définition et réglementation

Un antibiotique est une substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui à faible concentration, tue ou inhibe la croissance des microorganismes, mais n'affecte pas (ou peu) l'hôte. Plus précisément, un antibiotique est un antibactérien utilisé pour traiter les infections chez l'homme et chez les animaux (WHO 2011).Après la découverte de la pénicilline par A. Fleming en 1929, l'usage des antibiotiques en médecine humaine et animale n'a débuté que vers le milieu des années 1940. Dans les années 1950 et 1960, le nombre de familles d'antibiotiques et de molécules disponibles a augmenté, ainsi que leur utilisation.

Parallèlement, la découverte de bactéries résistantes puis celle de plasmides responsables de la multirésistance et de leur éventuelle transmission ont mis en évidence les risques liés à l'usage de ces molécules. Ainsi, après la conférence OMS de Brême de 1973, l'Union Européenne interdira chez les animaux l'utilisation, comme additifs alimentaires, des antibiotiques actifs sur les bactéries Gram négatives et utilisés en thérapeutique humaine et animale. Dans les années 1980, des résistances chez les bactéries Gram positives (Entérocoques) aux rares antibiotiques utilisables chez l'homme pour traiter les infections qu'elles engendrent, est mise en évidence (Spiramycine, Tylosine, Virginiamycine). Ces molécules appartenant à la famille des streptogramines étaient utilisées comme facteurs de croissance en alimentation animale, et cela va conduire à la fin des années 1990, à l'interdiction progressive de l'usage de ces antibiotiques comme additifs alimentaires.

L'Union Européenne a donc décidé au 1er janvier 2006 d'interdire complètement l'utilisation des antibiotiques comme additifs alimentaires (Anses 2014). Seuls les antibiotiques ionophores sont autorisés, comme coccidiostatiques, en tant qu'additifs à l'alimentation animale (Sanders *et al.* 2011). Depuis cette décision, les antibiotiques ne peuvent être administrés en Europe qu'avec un statut de médicaments vétérinaires et à ce titre ils sont soumis à des règles de prescription par les vétérinaires.

Ces médicaments vétérinaires sont évalués dans le cadre de la procédure d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du point de vue de leur qualité, de leur sécurité et de leur efficacité thérapeutique. Le fabricant doit également avoir déterminé le temps d'attente nécessaire pour éviter la présence de résidus (molécules mères ou métabolites) nocifs dans les denrées (viande, lait, œufs). L'AMM n'est délivrée que si le rapport bénéfice/risque est jugé favorable, le risque prenant en compte l'ensemble des aspects relatifs à la santé humaine, la santé animale et l'environnement (Sanders *et al.* 2011). Un arrêté du 18 mars 2016, publié au journal Officiel de la République Française indique la liste des antibiotiques critiques en médecine vétérinaire. Ainsi parmi les céphalosporines de troisième génération (C3G), le Céfopérazone, le Ceftiofur et la Céfovécine sont des molécules d'importance critiques mentionnées aux articles R. 5141-117-1 et R. 5141-117-2 du code de la santé publique. Ces antibiotiques ne pourront plus être prescrits aux animaux sans réalisation préalable d'un antibiogramme indiquant l'efficacité de cette unique molécule. Dans cet arrêté, les antibiotiques d'importance critique non autorisés pour un usage en médecine vétérinaire sont également présentés. Concernant les C3G, neuf molécules utilisées en médecine humaine y sont présentes (MINISTERE DE L'AGRICULTURE DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORET 2016).

2- Usage des antibiotiques en production porcine

Depuis 1999, l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV), au sein de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire Alimentation Environnement Travail (Anses), collecte les données des ventes de l'industrie pharmaceutique via une procédure qui lui permet de recueillir le nombre d'unité vendues annuellement. Ces données sont croisées avec les données de l'AMM (quantité de principes actifs par unité, voie d'administration, espèces cibles, posologie autorisée) pour estimer les quantités de principes actifs utilisées chaque année, les attribuer aux différentes espèces animales et estimer l'exposition exercée (Sanders *et al.* 2011). Par ailleurs, la France participe au projet « European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption » (ESVAC) qui a été lancé par l' Agence européenne du Médicament (EMA) à la demande de la commission Européenne, l'objectif étant de collecter des données de ventes d'antibiotiques harmonisées pour tous les pays de l'Union Européenne (Anses-ANMV 2014).

Pour déterminer le niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques, l'Animal Level of Exposure to Antimicrobials (ALEA) est calculé en tenant compte des différences d'activité et de posologie entre les antibiotiques et en prenant en compte l'évolution de la population animale. Il part de l'hypothèse de base que la totalité des antibiotiques vendus sur l'année ont été administrés aux animaux élevés sur le territoire national durant cette année (Anses 2015). Toutes espèces animales confondues, l'exposition globale en 2013 a diminué de 7,3% par rapport à l'année 2012. Entre 2012 et 2013, l'exposition aux antibiotiques a diminué de 4% chez les porcs (Anses-ANMV 2014).
En 2014, l'exposition globale a augmenté de 13,1% par rapport à l'année 2013. Une augmentation des ventes a été observées (11,8% par rapport à 2013), elle semble liée à la parution de la loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt (LAA) n°2014-1170 du 13 octobre 2014, qui instaure plusieurs mesures telles que la fin des remises, rabais et ristournes sur les antibiotiques à compter du 1er janvier 2015.

Cette perspective a, semble-t-il, conduit de façon paradoxale les acteurs de la distribution et/ou de la délivrance du médicament vétérinaire à faire des stocks de médicaments contenant des antibiotiques en fin d'année 2014. On considère habituellement que les ventes de médicaments de l'année sont représentatives de l'exposition des animaux pour la même année en partant du principe que l'ensemble des médicaments vendus ont été administrés aux animaux. Cette hypothèse ne semble pas valide pour 2014, du fait de ce stockage, qui serait estimé à environ 3 à 4 mois. L'évolution des chiffres d'affaires liés à la vente des médicaments vétérinaires conforte cette analyse puisqu'il est observé, au 1er semestre 2015 par rapport au 1er semestre 2014, une baisse de l'ordre de 40 % des ventes d'antibiotiques, baisse due en partie à la résorption du stockage effectué sur la fin d'année 2014. Il n'a donc pas été pertinent de réaliser une étude approfondie par espèce et par famille d'antibiotique (Anses-ANMV 2015). Compte-tenue de ces informations, ce mémoire va traiter des données obtenus jusqu'en 2013. Malgré la diminution en 2013, les porcs restent parmi les plus gros consommateurs d'antibiotiques (tableau 2). Toutefois, il faut signaler que le poids vif traité de porcs en 2013 a diminué de 32,7% par rapport à 1999, de 31,9% par rapport à 2009 et 5,7% par rapport à 2012. Les porcs sont principalement traités par voie orale (Figure IV). Cette diminution devrait se confirmer avec le plan EcoAntibio2017, qui a fixé un objectif de réduction de 25% en 5 ans de l'utilisation de l'ensemble des antibiotiques (Anses-ANMV 2014).

Tableau 2: Répartition des ventes 2013 entres les différentes espèces en tonnage de matière active et en quantité de matière active par kilogramme animal (Anses-ANMV 2014)

	Bovins	Chats et chiens	Chevaux	Poissons	Lapins	Ovins et caprins	**Porcs**	Volailles	autres	Total
Tonnage vendu	147,17	15,17	15,31	2,86	52,46	45,16	**262,12**	156,57	2,27	699,09
pourcentage (%)	21,10	2,20	2,20	0,40	7,50	6,50	**37,50**	22,40	0,30	100
ventes en mg/kg	15,81	96,68	51,44	63,57	517,57	78,93	**91,30**	85,60	65,25	45,95

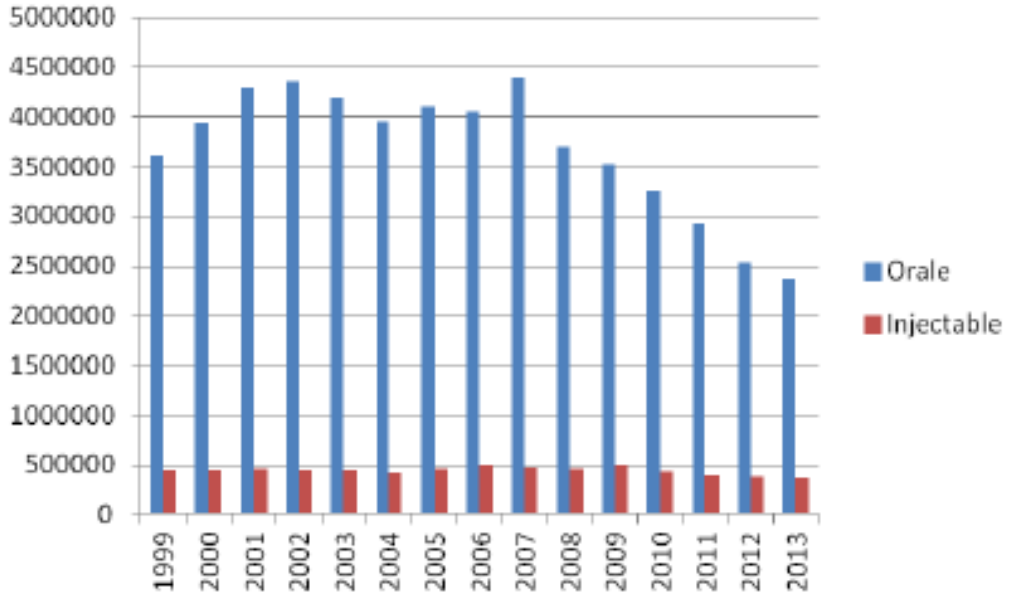


Figure V: Évolution du poids vif traité de porcs selon la voie d'administration (en tonnes) (Anses-ANMV 2014)

Les données collectées par l'ANMV permettent également d'observer l'évolution des familles d'antibiotiques vendues. Ainsi, il est montré que l'exposition des porcs aux antibiotiques a diminué de 27,7 % entre 2009 et 2013. Les antibiotiques les plus utilisés sont les tétracyclines et les polypeptides (essentiellement constitués de la colistine) comme le montre la figure VI.

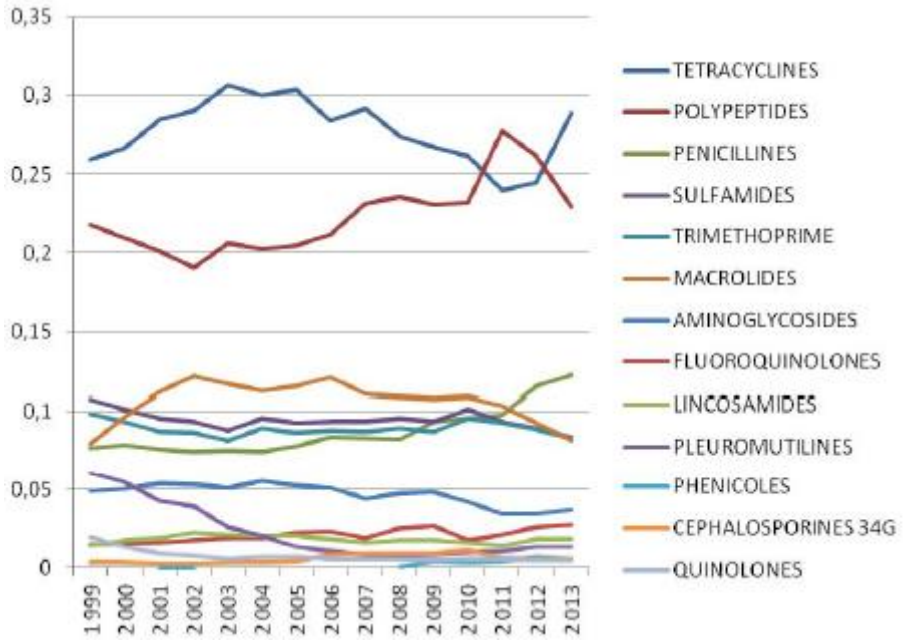


Figure VI: Évolution de la part des familles d'antibiotiques dans le poids vif traité des porcs (Anses-ANMV 2014)

Au niveau Européen, le rapport ESVAC souligne que, exprimés en mg/PCU (une approximation de la taille de la population animale), les ventes d'antimicrobiens, ont diminué de 22% en France, en comparaison à 2010. Le rang de la France se situe maintenant au 18ème rang par rapport aux 26 autres pays (Figure VII) (EMA 2014).

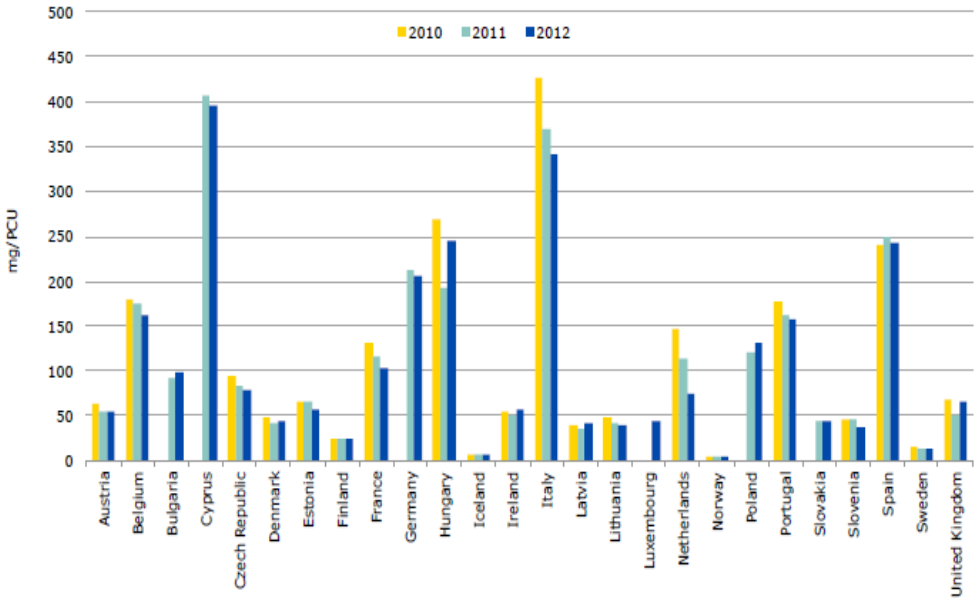


Figure VII: Ventes totales d'agents antimicrobiens vétérinaires pour les espèces productrices de denrées alimentaires (y compris les chevaux) en mg/PCU, au cours des années 2010 à 2012, pour les 26 pays de l'UE (EMA 2014)

En France, selon le rapport de l'ANMV, après une une forte augmentation entre 1999 et 2007, l'exposition des porcs aux céphalosporines de troisième et quatrièmes générations (C3G et C4G) a stagné entre 2007 et 2010, puis a diminué de 65,5% entre 2010 et 2013. Fin 2010, à la suite des alertes exposant l'augmentation rapide de la résistance aux C3G et C4G, les professionnels de la filière porcine ont volontairement décidé de limiter l'usage de ces antibiotiques et comme le montre la figure 9, cette décision a été largement suivie.

Selon les enquêtes réalisées par l'Anses, l'usage des C3G et C4G ne semble pas avoir évolué chez les truies mais la diminution chez les porcs charcutiers est considérable. Ainsi 36,5% des porcs charcutiers étaient traités aux céphalosporines de dernières générations en 2010, contre seulement 6,4% d'entre eux en 2013 (figure VIII). Cette diminution de la consommation de ces molécules d'importance critique pourrait encore s'accentuer avec le plan EcoAntibio 2017. En effet, ce plan sugère « l'arrêt de l'utilisation des céphalosporines de troisième et quatrième génération de manière préventive à l'occasion des soins des porcelets et utilisation uniquement en seconde intention à titre curatif après identification et démonstration de la sensibilité de la souche au moyen d'un antibiogramme » (Anses-ANMV 2014), comme cela a été repris par la nouvelle règlementation (arrêté du 18 mars 2016).

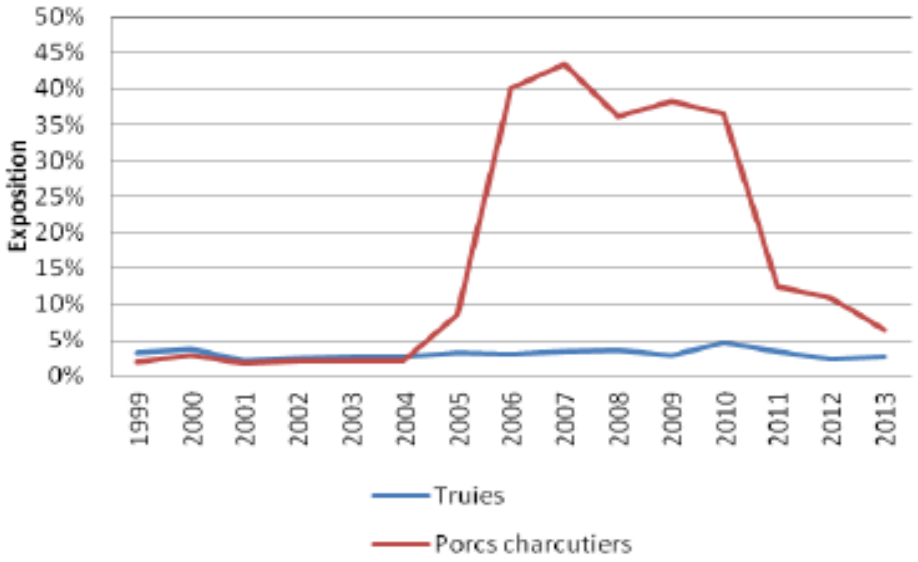


Figure VIII: Évolution de l'exposition des porcs aux céphalosporines (Anses-ANMV 2014)

Actuellement, les céphalosporines autorisées en France chez le porc sont le ceftiofur (Naxcel, Excenel) et et le cefquinome (Cobactan). Tout deux sont utilisés pour le traitement d'infections respiratoires associées à *Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Haemophilus parasuis et Streptococcus suis*. Le cefquinome (Cobactan) est également utilisé dans le traitement du syndrôme mammite-métrite-agalactie, des méningites à *Streptococcuss suis*, de l'épidermite à *Staphylococcus hyicus* et des arthrites à *Staphylococcus spp, Streptococcus spp, E. coli* et autres germes sensibles au cefquinome (Petit 2014). Toutefois comme indiqué plus haut, la nouvelle règlementation (arrêté du 18 mars 2016) devrait réduire leur utilisation.

3- Les céphalosporines de troisième génération (C3G)

3-1 Classification

Les céphalosporines de troisième génération appartiennent au groupe des céphèmes de la famille des β-lactamines. La structure de base des β-lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame, indispensable à l'activité de la molécule. Les β-lactamines se composent de quatre groupes de molécules : les pénames, les pénèmes, les céphèmes et les monolactames (Tableau 3).

Tableau 3: Classification des β-lactamines (Jehl 2004)

Groupe	Sous-groupe	Exemples d'antibiotique
Pénames	Méthoxy-pénames Pénicillines Oxapénames Carbapénames	Témocilline Pénicilline G, A, M Sulbactam Acide clavulanique
Pénèmes	Oxapénèmes Carbapénèmes Sulfopénèmes	Imipénème, Méropénème
Céphèmes	Oxacéphèmes **Céphalosporines** Céphamycines Carbacéphèmes	
Monolactames	Nocardicines Monobactames Monophasphames Monocarbanes Monosulfactames	Aztréonam

Plusieurs molécules appartenant au groupe des céphèmes ont été synthétisées depuis le milieu des années 1960. Il existe plusieurs classifications des céphèmes : chimique, microbiologique et pharmacocinétique (Bryskier 1999). La classification des céphalosporines la plus retrouvée est la classification microbiologique c'est-à-dire en fonction de leurs spectres d'activités (tableau 4). La figure IXI représente la structure chimique des céphalosporines.

Tableau 4: Tableau représentant les différentes classes de céphalosporines associées à leur spectre d'action (Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the Committee for Medicinal Products for Veterinary 2009)

Classe	Spectre
C1G	excellente activité contre les coques Gram positif, incluant les Staphylocoques producteurs de pénicillinases mais leur activité contre les bactéries Gram négatives est limitée
C2G	meilleure activité comparée aux C1G et sont généralement plus actives contre les bactéries Gram négatives
C3G	un large spectre d'activité avec une stabilité encore, accrue contre les β-lactamases qui inactivent les C1G et les C2G
C4G	spectre d'activité plus important contre les bactéries Gram négatives et sa stabilité est meilleur que les C3G

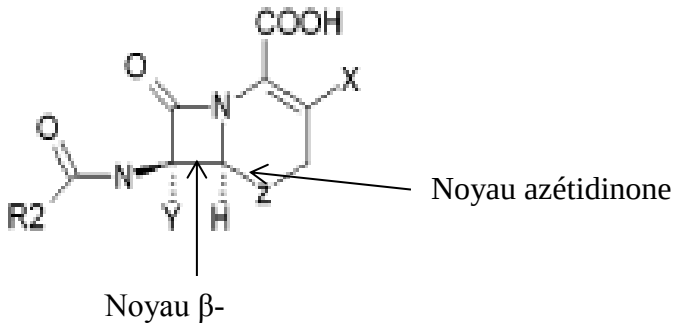


Figure IX: Structure chimique des céphalosporines (Macheboeuf *et al*. 2006)

3-2 Mécanisme d'action

Les cibles des β-lactamines sont les protéines liant la pénicilline (PLP), situées sur la surface de la membrane cytoplasmique. La membrane externe représente la seule barrière de perméabilité importante pour la pénétration des β-lactamines. Les β-lactamines empruntent principalement la voie des porines pour franchir la membrane externe. Les porines sont des protéines de 35 à 40 kDa formant dans la membrane externe des canaux aqueux permettant une diffusion passive des molécules hydrophiles de masses moléculaires inférieures à 600 Da. La taille, la charge et l'hydrophobicité des β-lactamines conditionnent leur capacité à diffuser à travers la membrane.

Les PLP sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, à savoir des glycosyltransférases, des transpeptidases et des carboxypeptidases. Généralement, seules les glycosyltransférases et les transpeptidases sont sensibles à l'action des β-lactamines. Ces enzymes sont classées en fonctions leur poids moléculaire. Chez *E. coli*, les enzymes de poids moléculaires élevés sont les PLP1A, 1B, 1C, 2 et 3 et celles de faible poids moléculaire sont des carboxypeptidases. Le tableau 5 récapitule les différentes PLP intervenant dans la synthèse du peptidoglycane lors de la division cellulaire chez *E. coli* (Courvalin 2012a; Typas *et al.* 2012).

Tableau 5: Protéines liant la pénicilline intervenant dans la synthèse du peptidoglycane chez *E. coli* (Typas *et al*. 2012)

Fonction	Activités enzymatiques	Protéines	Caractéristiques
Synthèse du peptidoglycane	Glycosyltransférases-transpeptidases	PLP1A	● Intervient dans la synthèse du peptidoglycane, principalement au moment de l'élongation cellulaire ● ancré dans la membrane interne
		PLP1B	● Intervient dans la synthèse du peptidoglycane, principalement au moment de la division cellulaire ● ancré dans la membrane interne
		PLP1C	● Rôle cellulaire inconnu ● ancré dans la membrane interne
	Gycosyltransférases	PLP2	● Essentiel lors de l'élongation cellulaire ● ancré dans la membrane interne
		PLP3	● Essentiel lors de la division cellulaire ● ancré dans la membrane interne
Régulation structurale du peptidoglycane	Carboxypeptidases	PLP5, PLP 4L, PLP6 et PLP6L	● Rôle dans la régulation de la synthèse du peptidoglycane
Hydrolyse du peptidoglycane	Endopeptidases	PLP4 et PLP7	● Intervient lors de la séparation du septum ● Intervient dans la formation de Biofilm

Les β-lactamines présentent une analogie structurale avec le dipeptide D-Ala-D-Ala qui constitue le substrat naturel des PLP. L'antibiotique se fixe sur le site actif des PLP, entrainant l'ouverture du cycle β-lactame. L'ouverture de ce cycle entraine la formation d'une liaison covalente, activant l'effet catalytique des PLP. L'effet des β-lactamines dépend de leur affinité pour les différentes PLP. En effet, la plupart des céphalosporines ont une affinité pour les PLP1A et 3. L'inhibition des PLP entraine l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane et donc un arrêt de la croissance bactérienne.

Un effet bactéricide est également observé. Celui-ci résulte de l'inhibition des PLP, entrainant une altération du peptidoglycane qui induirait une activation d'autolysines comme la muréine hydrolase ou une endopeptidase. Cette activation enzymatique conduit à la lyse bactérienne (Jehl 2004; Courvalin 2012b).

3-3 Résistance aux β-lactamines : les β-lactamases

3-3-1 Classification des β-lactamases

La résistance aux β-lactamines chez les bactéries Gram négatives peut être due à trois différents mécanismes : mutations des PLP, réduction de la perméabilité de la cellule et production de β-lactamases capables d'inactiver le noyau β-lactame. Ce dernier mécanisme est le plus fréquemment rencontré chez les *Enterobacteriaceae* (Seiffert *et al*. 2013).

Ces enzymes périplasmiques agissent en hydrolysant une liaison amide du noyau β-lactame et peuvent être regroupées selon la classification de Amber (de A à D), basée sur des homologies des séquences d'acides aminés (Ambler 1980; Seiffert *et al.* 2013).

Déjà en 1980, Ambler avait reconnu deux groupes d'enzymes. La classe A (sérine-β-lactamases) regroupe les enzymes présentant une serine hydrolase et les enzymes de la classe B (metallo-β-lactamases) qui ont besoin d'un cation bivalent, de préférence le zinc pour l'hydrolyse des β-lactamines (Pfeifer *et al.* 2010). En 1981, Jaurin et Grundström ont élargi le groupe des sérine-β-lactamases avec la reconnaissance de la classe C (Jaurin & Grundstrom 1981) et en 1987, Ouellette et *al.* ont présenté la classe D (Ouellette *et al.* 1987). Les trois classes appartenant au groupe des sérine-β-lactamases comprennent également des DD-peptidases et une variété de protéines de liaison aux PLP. Toutes ces protéines contiennent un motif Ser-X-X-Lys où la sérine est le résidu du site actif. Bien que clairement homologues, les trois classes de sérine-β-lactamases présentent un grand degré de variabilité et seulement un petit nombre de résidus sont conservés en plus de la sérine catalytique (http://prosite.expasy.org/PDOC00134) (consulté le 15 avril 2016). En 1995, Bush et al. ont présenté un autre système de classification fonctionnelle des β-lactamases (Bush *et al.* 1995). Le tableau 6 présente la classification des β-lactamases selon la classification d'Amber.

Tableau 6: Classification des β-lactamases selon Amber (Pfeifer *et al*. 2010)

	Classe β-lactamase	β-lactamase	Exemples d'enzymes	Espèces/genres	Résistance phénotypique Spectre d'action
Sérine-β-lactamases	A	β-lactamases à large spectre	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11	*Enterobacteriaceae*	Ampicilline, Céphalotine
		BLSE de type TEM	TEM-3, TEM 52		Pénicilline, Céphalosporine de 3ème génération
		BLSE de type SHV	SHV-5, SHV-12		
		BLSE de type CTX-M	**CTX-M-1, CTX-M-15**		
		Carbapenemases	KPC, GES, SME		Toutes les β-lactamines
	C	AmpC Céphamycinases chromosomiques	AmpC	*Enterobacter spp Citrobacter spp*	Céphamycines (Céfoxitine), Céphalosporines de 3ème génération
	D	AmpC Céphamycinases plasmidiques	CMY, DHA, MOX, FOX, ACC	*Enterobacteriaceae*	Céphamycines (Céfoxitine), Céphalosporines de 3ème génération
		β-lactamases large spectre	OXA-1, OXA-9	*Enterobacteriaceae*	Oxacilline, Ampicilline, Céphalotine
		BLSE de type OXA	OXA-2, OXA-10		Pénicilline, Céphalosporines de 3ème génération
		Carbapénémases	OXA-48, OXA-23, -24, -58		Ampicilline, Imipénème, toutes les β-lactamines
Métallo-β-lactamases	B	Metallo-β-lactamases	VIM, IMP	*Enterobacteriaceae*	toutes les β-lactamines

3-3-2 Focus sur les BLSE de type CTX-M

Les BLSE de type CTX-M (pour Céfotaximase, première fois isolée à Munich) ont été pour la première fois décrites en 1989 à partir d'un *E. coli* isolé en Allemagne. Pendant longtemps, les enzymes CTX-M étaient classées en cinq groupes selon leurs séquences en acides aminés (Poirel *et al.* 2012). Plus récemment, un sixième groupe (Groupe KLUC) a été ajouté.

Dans chaque groupe, de nombreuses enzymes sont retrouvées et se distinguent par une ou quelques substitutions d'acides aminés (tableau 7) (D'Andrea *et al.* 2013).

Ce type d'enzyme confère à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance aux céfotaxime, céfépime et aztréonam qu'à la ceftazidime. Certaines d'entre elles ont ensuite évolué vers un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles que les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23 ou encore CTX-M-32 dérivant par une simple mutation de CTX-M-1 (Philipon 2013).

Tableau 7: Classification des BLSE de type CTX-M (Poirel *et al*. 2012)

Groupes	Enzymes (exemples)
CTX-M-1	CTX-M-1/3/10-12/15/22/23/28-30/32/34/36/37/42/52-54/57/58/60/61
CTX-M-2	CTX-M-2/4/7/20/31/35/43/44
CTX-M-8	CTX-M-8/40/63
CTX-M-9	CTX-M-9/13/14/16/17/19/21/24/27/38/46-51/55/65
CTX-M-25	CTX-M-25/26/39/41
KLUC	KLUC-1/2/4

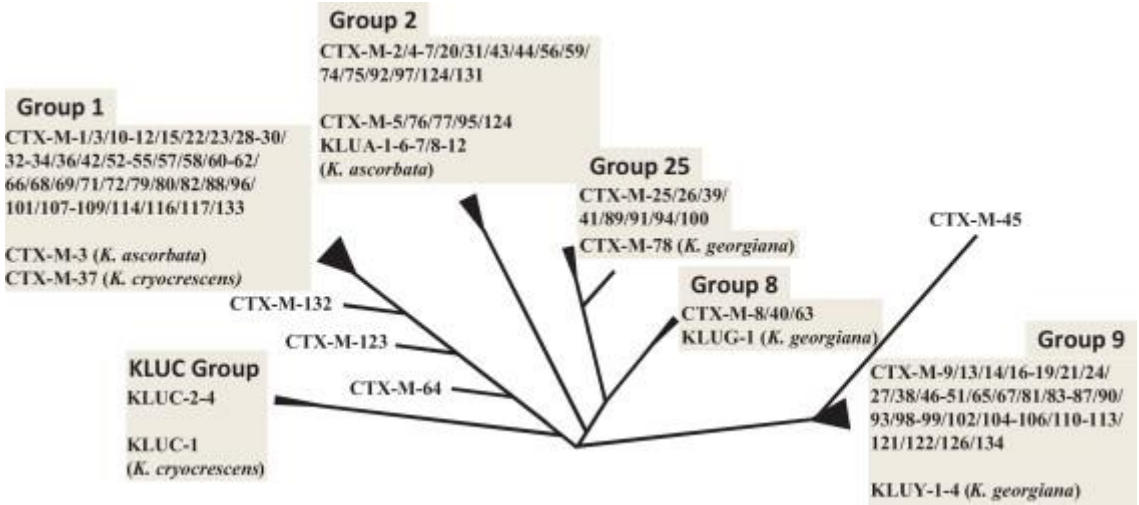


Figure X: Arbre phylogénétique montrant la similarité des enzymes CTX-M et les membres des différents groupes (D'Andrea *et al*. 2013)

La figure X représente une analyse phylogénétique des différents groupes des BLSE de type CTX-M. Dans chaque groupe sont présentes un certain nombre d'enzymes. Cependant, au moins quatre variantes présentant des structures hydrides sont également présentes sur cet arbre. L'enzyme CTX-M-45 représente un hybride de l'enzyme CTX-M-14 avec une protéine d'origine inconnue. Les enzymes CTX-M-64, 123 et 132 sont des hydrides de l'enzyme CTX-M-15 (D'Andrea *et al.* 2013).

La majorité des différentes enzymes sont représentées dans les groupes CTX-M-1 et CTX-M-9, ce qui suggère une plus grande plasticité de ces groupes (D'Andrea *et al.* 2013). Cependant, cela pourrait aussi refléter une prévalence plus élevée pour les membres de ces groupes (Canton *et al.* 2012).

L'analyse phylogénétique des gènes *bla*$_{CTX-M}$ indique que les ancêtres communs sont des gènes chromosomiques présents chez l'espèce *Kluyvera (*Poirel et *al. 2012),* un membre de la famille des *Enterobacteriaceae* qui est rarement associé à des infections humaines.

Des homologies ont été détectées dans des gènes du groupe CTX-M-1 et du groupe KLUC avec le chromosome de souches de *Kluyvera cryocrescens*. Des homologies ont également été trouvées entre des souches de *Kluyvera ascorbata* et des gènes présents dans les groupes CTX-M-1 et 2 et entre des souches de *Kluyvera georgiana* et des gènes présents dans les groupes CTX-M 8, 9 et 25 (D'Andrea *et al.* 2013). L'enzyme KLUC-1 présente dans le groupe KLUC montre une homologie de séquence en acides animés de 85% à 86% avec le groupe CTX-M-1 (Poirel *et al.* 2012). Les différentes variantes au sein de chaque groupe pourraient refléter différents évènements de capture de gènes ou une microévolution de la protéine dans les hôtes qui serait probablement influencée par une pression sélective utilisée en médecine humaine et vétérinaire. Enfin, les enzymes CTX-M avec une structure hydride sont apparemment des évènements de recombinaisons entre des gènes de différents groupes (D'Andrea *et al.* 2013). La coexistence dans un même hôte de multiples CTX-M a été rapportée (Morosini *et al.* 2010) et pourrait favoriser l'émergence des hybrides. L'apparition d'au moins trois hybrides entre les enzymes CTX-M-15 et CTX-M-14 (à savoir CTX-M-64, 123 et 132) pourrait résulter de la prévalence élevée de ces enzymes (Canton *et al.* 2012).

3-3-3 Prévalence et facteurs de risque

- Prévalence

Les bactéries productrices de BLSE ont été pour la première fois décrites dans les années 1980, dans des souches hospitalières. L'émergence et la diffusion dans le monde entier ont été rapides, entrainant un enjeu majeur pour la santé publique. Plus récemment, des souches capables de résister non seulement aux pénicillines, mais également aux céphalosporines de première, deuxième ou troisième générations sont apparues chez l'homme (Poirel *et al.* 2012) puis dans différentes filières animales (Meunier *et al.* 2006).

D'abord détectées parmi les souches pathogènes en France, grâce au réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes pour l'animal (RESAPATH), elles ont été ensuite mises en évidence dans le microbiote digestif du porc arrivant à l'abattoir ou dans leur viande (Anses 2010). Différentes publications rapportent que les gènes codant pour des BLSE ont été identifiés chez des isolats d'origine porcine. En France, comme dans beaucoup de pays, le gène le fréquemment rencontré est le gène *bla*$_{CTX-M-1}$ (Perrin 2011), mais de nombreux autres gènes tels que les gènes *bla*$_{CTX-M-2}$, *bla*$_{CTX-M-9}$, *bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{CTX-M-22}$, *bla*$_{CTX-M-27}$, *bla*$_{CTX-M-32}$, *bla*$_{CTX-M-55}$, *bla*$_{CTX-M-65}$ ont été détectées sur des isolats porcins (EFSA 2011). Les gènes codant pour ces β-lactamases sont fréquemment situés sur des plasmides conjugatifs, susceptibles d'être transmis d'une souche d'*E. coli* vers une autre souche d'*E. coli* ou vers d'autres entérobactéries telles que *Salmonella*.

Par ailleurs, les plasmides comportant des gènes de résistances aux céphalosporines à spectre étendu hébergent également fréquemment des gènes de résistances à d'autres antibiotiques (tétracyclines, sulfamides, triméthoprime) conduisant à des phénomènes de co-sélection de souches multi-résistantes : l'utilisation d'un de ces antibiotiques pour lequel le plasmide porte un gène de résistance contribuera à sélectionner les bactéries porteuses de ce plasmide et donc résistantes à toutes ces familles d'antibiotiques (Kempf 2014). Il a été montré que les gènes $bla_{\text{CTX-M}}$ sont portés par différents groupes de plasmides. Ainsi, le gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ est fréquemment porté par un plasmide de la famille IncF (Carattoli 2009), alors que le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ est lui souvent porté par un plasmide de type IncI1.

En 2005, des souches d'*E. coli* porteuses du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ ont été isolées dans 10,7% des échantillons de matières fécales de volailles prélevés dans 10 abattoirs de 7 villes françaises; tous localisés sur un plasmide IncI1 (Girlich *et al.* 2007). Plus récemment, chez l'homme, ce gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ présent dans des souches d'*E. coli* a également été associé au plasmide IncI1; suggérant un lien potentiel entre l'homme et l'animal pour la dissémination de ce gène. Il a été montré une variabilité du plasmide IncI1. Cependant, tous les plasmides IncI1 sont caractérisés par la présence de gène codant pour des pilis de type IV contribuant à l'adhésion, la mobilité ou encore la conjugaison (Dudley *et al.* 2006; Carattoli 2009). Ce gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ peut-être porté par des plasmides d'autres groupes d'incompatibilité. En France, en Espagne, au Danemark et en Italie, le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ a été identifié sur un plasmide IncN à partir de souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* isolées chez des patients ou des porcs (Carattoli 2009; Moodley & Guardabassi 2009). Ce gène a été également découvert sur le plasmide IncL/M (Moodley & Guardabassi 2009).

En 2012, dans le cadre de la surveillance officielle programmée des zoonoses et agents zoonotiques par la directive 2003/99/EC, le pourcentage moyen des sept pays européens rapportant des résultats était 1,4% de souches d'*E. coli* commensales porcines résistantes aux C3G. Concernant la France, ce taux était de 2% ; taux le plus élevé depuis 2009 (EFSA 2014). Ce portage d'*E. coli* résistants aux C3G dans le microbiote digestif entraine la présence, heureusement relativement rare, de souches dans les viandes de porcs, mais aussi, par le biais des effluents contaminés, la dissémination de ces bactéries, plasmides ou gènes dans l'environnement (EFSA 2011; Rodrigues *et al.* 2013). Par ailleurs, les porcs peuvent être infectés par des souches d'*E. coli* pathogènes. Une tendance à la hausse de souches ETEC avec un phénotype de multi résistance (MDR) a été observée chez les porcs (Wang *et al.* 2010). Une étude réalisée chez le porc en Australie sur la résistance des ETEC a démontré que 92,8% des isolats étaient résistants à un ou plusieurs antibiotiques et 64,3% étaient MDR. Des résistances à la céfoxitine (14,3%) et à la céphalexine (7,1%) ont été observées sur des ETEC isolées de cas de diarrhée néonatale et post-sevrage (Abraham *et al.* 2014). En France, selon le réseau RESAPATH, le pourcentage d'*E. coli* pathogènes non sensibles au ceftiofur est en 2014 de 2,55% (39 souches non sensibles/ 1527 souches testées), inférieur au taux de 6,7% (101 souches non sensibles / 1510 souches testées) enregistré en 2010, année marquant la réduction massive de l'utilisation des C3G chez le porc (figure XI) (Anses 2015).

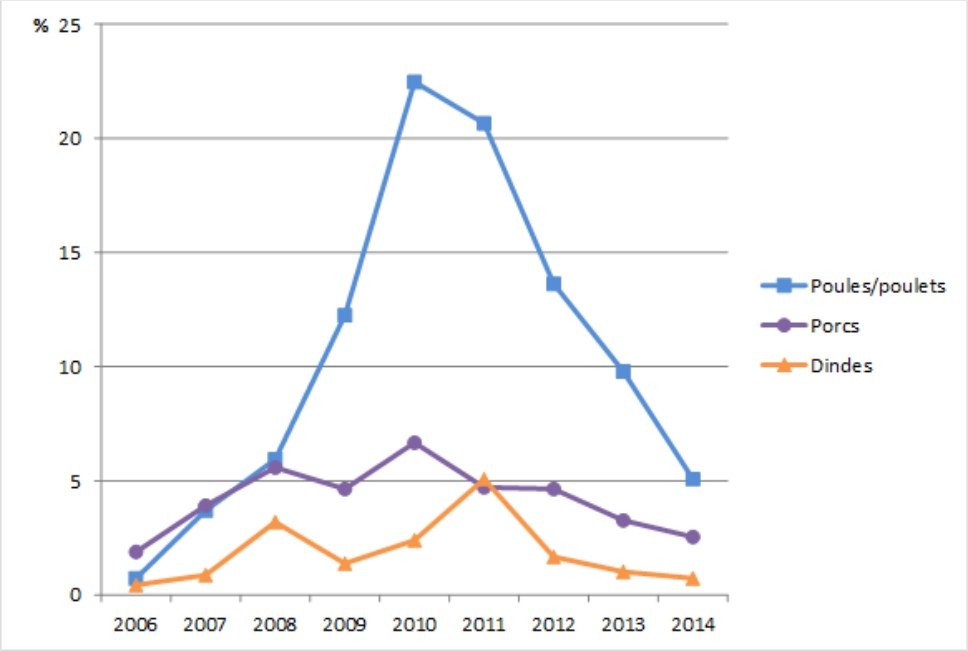


Figure XI: Évolution des proportions de souches pathogènes d'*E. coli* non-sensibles au ceftiofur chez les porcs, poules/poulets et dindes (2006-2014) (Anses 2015)

➢ Facteurs de risques

Plusieurs études ont montré que l'administration de β-lactamines aux doses recommandées conduit à amplifier la proportion d'entérobactéries résistantes au sein de la flore fécale des animaux traités. Les modalités d'élevages et les modalités d'utilisation des antibiotiques peuvent également avoir un impact sur la dissémination de bactéries résistantes. De manière générale, l'augmentation de la densité des groupes d'animaux va accroître les risques d'émergence de la pathologie et donc de l'utilisation d'antibiotiques. En cas de traitement de groupe, la taille des populations animales exposées à un antibiotique et la taille des populations non exposées, tout comme les densités d'animaux et le nombre de contacts entre eux, directs ou indirects dans leurs lieux de vie (prairies, enclos, cases, bâtiments), sont des paramètres modulant la capacité de sélection et de dissémination des bactéries résistantes et sensibles dans l'élevage et son environnement. Par conséquent, la gestion des effluents d'élevage, leur utilisation pour l'amendement des sols, les traitements utilisés sont des facteurs jouant un rôle dans la survie ou la dissémination bactérienne, des clones et des gènes de résistance mais également la dissémination d'antibiotiques sous formes de résidus vers l'eau et les sols (Anses 2014).

Les types de traitements antibiotiques sont des facteurs influençant le risque de développement de l'antibiorésistance. Lors d'un traitement préventif, le risque associé à la pression de sélection exercée sur les bactéries des flores commensales est présent chez tous les animaux traités, alors que le bénéfice thérapeutique est dépendant de l'élimination effective de la bactérie pathogène, dont la présence n'est que suspectée. Le rapport bénéfice/risque des traitements préventifs apparait donc comme défavorable en matière de risque de résistance aux antibiotiques. Ce type de traitement ne devrait plus être utilisé avec le plan EcoAntibio 2017.

Un arrété du 27/07/2015 décrit l'utilisation d'antibiotique en traitement préventif « L'usage préventif de médicaments antibiotiques est limité à des situations particulières et pour lesquelles il n'existe pas d'autre moyen de gestion. Il ne peut en aucun cas se substituer à une indispensable maîtrise sanitaire. Une réflexion approfondie sur ce type de situation est à mener dans chaque filière. La limitation de ces modes d'usage des antibiotiques passe également par une réflexion sur l'évolution des pratiques et sur les alternatives possibles ».

Les spectres d'activité des antibiotiques peuvent également constituer des facteurs de risques de dissémination de l'antibiorésistance. En effet, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, initialement destinés à lutter contre une infection insuffisamment caractérisée, aura un impact étendu, non seulement sur la flore pathogène mais également sur la flore commensale, ce qui entraine un pouvoir sélectionnant plus fort. Il est donc préférable de privilégier des antibiotiques à spectre étroit autant que possible (Anses 2014).

Un certain nombre d'études ont évalué l'impact de la durée d'un traitement antibiotique sur l'amplification des résistances au sein des flores commensales. La mise en relation des résultats suggère que la diminution de la durée des traitements antibiotiques pourrait constituer un des leviers d'action les plus prometteurs pour réduire l'émergence de résistances dans les flores commensales, sans perte d'efficacité contre les infections (WorldHealthOrganization 1999).

Matériels et méthodes

I- Mise en place des différentes PCR quantitatives

Les nombres de copies des cibles *E. coli* totaux, *E. coli* ED1a, *E. coli* Nissle1917 et le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ étudiées dans ce projet ont été quantifiés par PCR. Pour chaque PCR, la sensibilité et la spécificité de diagnostic, la spécificité analytique ainsi que la limite de détection ont été déterminées.

1- Spécificité analytique

La spécificité analytique est la capacité d'une PCR à n'amplifier que la séquence d'ADN d'intérêt ou cible. Afin d'évaluer ce paramètre, différentes espèces bactériennes provenant de la même niche écologique contenant ou non des gènes de résistances ont été analysées par PCR en temps réel. Le tableau 8 récapitule toutes les espèces bactériennes testées en fonction de la PCR quantitative.

2- Sensibilité et spécificité de diagnostic

L'évaluation de la sensibilité et la spécificité de diagnostic a été réalisée par l'analyse d'ADN issu de prélèvements de fécès collectés chez des porcs EOPS non inoculés et de prélèvements de porcs inoculés *in vivo* avec les souches étudiées, à l'exception des PCR quantitatives *E. coli* et du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. Sachant que les porcs EOPS hébergent des *E . coli*, les ADN des souches de *Klebsiella* et des souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont donc été utilisées comme échantillons négatifs pour la PCR en temps réel *E. coli*. Ces souches ont été au préalable testées par la PCR classique *E. coli* (Bej *et al.* 1991) afin de s'assurer du statut négatif de l'échantillon. Le statut positif pour les ADN issus de souches contenant le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a été vérifié grâce à la PCR classique du gène $bla_{CTX\text{-}M}$ (Woodford *et al.* 2006). Le récapitulatif des échantillons testés en PCR pour la détermination de la sensibilité et la spécificité de diagnostiques est présenté dans le tableau 9.

L'extraction d'ADN à partir de prélèvements de matières fécales et à partir des souches a été décrite dans le paragraphe V-1 (page 53) et dans le paragraphe IV-2 (page 47). Les différentes PCR utilisées pour vérifier le statut réel des échantillons ont été décrites dans les annexes 1 et 3.

Tableau 8: Les différentes souches testées ainsi que le nombre de souches pour l'évaluation de la spécificité analytique

	Campylobater coli	*Campylobater jejuni*	*Enterococcus faecalis*	*Enterococus faecium*	*Salmonella*	*Staphylocoque aureus*	*Acinetobacter baumanii*	*Klebsiella pneumoniae*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Shigella*	***E. coli* d'origine humaine (TN03)**	***E. coli* Nissle**	***E. coli* ED1a**	***E. coli* d'origine porcine**	***E. coli* contenant le gène *bla*$_{CTXM-1}$**	***E. coli* contenant le gène *bla*$_{CTXM-2}$**	***E. coli* contenant le gène *bla*$_{CTXM-3}$**	***E. coli* contenant le gène *bla*$_{CTXM-9}$**	***E. coli* contenant le gène *bla*$_{CTXM-28}$**	***E. coli* contenant le gène *bla*$_{TEM}$**	***E. coli* contenant le gène *bla*$_{SHV}$**	***E. coli* contenant le gène *bla*$_{CMY2}$**	**plasmide PCR4-TOPO contenant le gène *bla*$_{CTXM-1}$**
qPCR *E. coli*	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	NT	NT	NT	× (1)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	× (1)
qPCR CTX-M G 1	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (13)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	NT
qPCR ED1a	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (13)	× (1)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
qPCR Nissle	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (1)	× (13)	× (1)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

× *: souche testée ; NT : non testée ; (n) : nombre de souches ou plasmides testées*

Tableau 9: Echantillons testés en PCR afin de déterminer la sensibilité (Se) et la spécificité (sp) de diagnostiques

PCR quantitative	Echantillons
qPCR *E. coli*	40 prélèvements de fécès de porcs EOPS non inoculés
	36 souches de *Klebsiella* et par 4 souches de *Pseudomonas aeruginosa*
qPCR CTX-G1	47 ADN issus de souches contenant le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$
	46 prélèvements de fécès de porcs EOPS
qPCR *E. coli* ED1a	50 prélèvements de fécès de porcs EOPS non inoculés par *E. coli* ED1a
	30 prélèvements de porcs inoculés avec la souche *E. coli* ED1a
qPCR *E. coli* Nissle	50 prélèvements de fécès de porcs EOPS non inoculés par *E. coli* Nissle
	50 prélèvements de porcs inoculés avec la souche *E. coli* Nissle

La formule utilisée afin d'évaluer la spécificité diagnostique était la suivante : VN/ (VN+FP). Le tableau 23 explique le calcul de la sensibilité (Se) et de la spécificité de diagnostiques (Sp) d'une méthode.

Tableau 10: Calcul de la sensibilité (Se) et de la spécificité (Sp) diagnostiques de la méthode

		Statut réel de l'échantillon	
		Positif	**Négatif**
Réponse à la méthode	**Positif**	VP	FP
	Négatif	FN	VN
	Total	VP+FN	VN+FP
		Se=VP/(VP+FN)	Sp=VN/(VN+FP)

VP : vrai positif ; FN : faux négatif ; FP : faux positif ; VN : vrai négatif ; Se : sensibilité de diagnostique ; Sp : spécificité de diagnostique

3- <u>Limite de détection</u>

La limite de détection a été déterminée par l'analyse de 10 gammes de dilutions décimales de la souche étudiée ou du plasmide contenant le gène de résistance étudié. La préparation des gammes des souches étudiées a été décrite dans le paragraphe V-2-1 (page 54) et dans le paragraphe V-3-2 (page 56) est décrite la préparation de la gamme du plasmide contenant le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$.

II- Préparation des souches utilisées lors des différentes expérimentations

1- Les différentes souches

Quatre souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées lors des différents essais. La souche *E. coli* M63, *E. coli* TN03 et deux souches utilisées comme probiotiques (*E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle). Leurs principales caractéristiques et références sont décrites dans le tableau 11.

Tableau 11: Caractéristiques des souches utilisées pour ce projet

Nom de la souche	Génotype	source
***E. coli* M63**	*E. coli* non pathogène pour le porc. Possède une résistance chromosomique à la rifampicine et une résistance plasmidique aux C3G via un gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. Appartient au groupe phylogénétique B1.	Souche construite dans l'unité. Voir le protocole ci-dessous.
***E. coli* TN03**	Appartient au clone *E. coli* O25b-ST131. Pathogène pour l'homme. Possède une résistance plasmidique aux C3G via le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$. Appartient au groupe phylogénétique B2 sous-groupe I.	Rogers et al. 2010 (Rogers *et al.* 2011)
***E. coli* ED1a**	*E. coli* non virulent, bon colonisateur Appartient au groupe phylogénétique B2 VIII.	Clermont et al. 2008 (Clermont *et al.* 2008b)
***E. coli* Nissle 1917**	Appartient au sérotype O6 :K5 :H1 Appartient au groupe phylogénétique B2	Barth S. et al. 2009 (Barth *et al.* 2009) Déterminé dans l'unité

2- Préparation de la souche résistante : *E. coli* M63

Afin de favoriser l'implantation de la souche *E. coli* R-C3G chez les porcs EOPS (Exempts d'Organisme Pathogènes Spécifiés) et de faciliter l'étude des transferts de gènes, une souche *E. coli* isolée de porcs EOPS a été préparée en la rendant résistante à la Rifampicine et porteuse d'un plasmide contenant le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$.

2-1 Préparation de la souche receveuse

Pour cela, une souche d'*E. coli* sensible aux antibiotiques a été collectée à partir de matières fécales de porcs EOPS de l'Anses Ploufragan. Pour cela, une oese de matière fécale a été ensemencée sur une gélose Mac Conkey (MC) (OXOID, Dardilly, France). Suite à l'incubation de 24h à 37°C, l'identification de la souche a été vérifiée par PCR (Bej *et al.* 1991). Sa non-appartenance aux pathotypes du porc a été contrôlée par séro-agglutination à l'aide de sérums (anti K85, K87, K88, K81, K82 et F6 (987P) (Biovac, France)). Cette souche a été ensuite rendue résistante à la rifampicine par culture sur milieu supplémenté avec 250 mg/l de rifampicine (Rif) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Le groupe phylogénétique de l''isolat a été déterminé par PCR (Clermont *et al.* 2013).

2-2 Préparation de la souche donneuse

Une souche d'*E. coli* R-C3G a été choisie dans la collection disponible au laboratoire. Il s'agit d'une souche obtenue à partir de matières fécales d'un porc sain prélevé à l'abattoir dans le cadre du plan de surveillance de l'antibiorésistance de 2005. L'identification de cette souche a été vérifiée par PCR (Bej *et al.* 1991) ainsi que la présence du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (Woodford *et al.* 2006).

2-3 Conjugaison entre la souche donneuse et la souche receveuse

La souche receveuse et la souche donneuse ont été cultivées ensemble avec 2 mg/l de céfotaxime (CTX) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) dans du bouillon Mueller Hinton (MH) (Biorad, Marne la Coquette, France). Après 24 heures d'incubation, la culture a été centrifugée à 16000g pendant 15 minutes. Le culot obtenu a été déposé sur une gélose MH (Biorad), supplémentée en CTX (2 mg/l) et en Rif (250 mg/l). L'identification (Bej *et al.* 1991), la résistance aux deux antibiotiques ainsi que le groupe phylogénétique du transconjugant *E. coli* M63 obtenu ont été vérifiés (Clermont *et al.* 2013). La détermination du groupe plasmidique d'incompatibilité a été effectuée grâce à une PCR replicon typing (Carattoli *et al.* 2005). Le séquençage du plasmide entier contenant le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ a été réalisé (Fleury *et al.* 2015).

III- Les protocoles expérimentaux

1- Préparation des inoculums

1-1 Préparation des souches résistantes *E. coli* M63 et *E. coli* TN03

Les souches ont été préparées de la façon suivante :

Les souches ont été repiquées sur gélose MH supplémentée avec 2 mg/l de CTX. Après 24 heures d'incubation à 37°C ± 2°C, pour chaque souche, trois tubes de 5 ml de suspensions en eau physiologique, d'une densité optique égale à 1 Mac Farland ont été préparés. Trois boites carrées de gélose de MH supplémentée en CTX (2 mg/l) ont été ensemencées par inondation des suspensions à 1 Mac Farland. Ces boites ont été incubées 24h à 37°C ± 2°C.

Pour chaque souche, l'ensemble de la culture bactérienne a été repris dans 4 ml d'eau peptonnée tamponnée puis dilué dans un volume final de 130 ml. Le titrage des suspensions bactériennes a été réalisé par des dilutions décimales de la suspension finale jusqu'à la dilution 10^{-8}. Cent µl des dilutions 10^{-6}, 10^{-7} et 10^{-8} ont été ensemencés sur des géloses de MH à raison de 3 boîtes par dilution. Après 24 heures d'incubation, les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont été dénombrées. La dilution comprenant environ une centaine de colonies par boîte a été retenue et une moyenne des trois boîtes a été faite. Cette moyenne a été ensuite multipliée par le facteur de dilution et ramenée en litre, de façon a obtenu des UFC/l.

1-2 Préparation des cultures des probiotiques *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle 1917

Pour les différentes expérimentations, les souches *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle 1917 ont été préparées de la façon suivante :

Les souches ont été repiquées sur la gélose MH. Après 24 heures d'incubation à 37°C ± 2°C, pour chaque souche, 15 tubes contenant 5 ml de suspension bactérienne en eau physiologique ont été ajustés à une densité optique égale à 1 Mac Farland. Trois boîtes carrées de MH par souche ont été inondées à l'aide de 4 ml de la suspension à 1 Mac Farland. Ces boîtes ont été incubées 24h à 37°C ± 2°C. Pour chaque boîte, la culture a été reprise dans 4 d'eau peptonnée tamponnée et l'ensemble des suspensions obtenues pour chaque souche a été dilué dans un volume final de 750 ml. Le titrage des suspensions bactériennes a été réalisé comme décrit dans le paragraphe III-1-1 (page 35). La suspension finale a été répartie en 3 flacons (250 ml par flacon). Un flacon a été utilisé par jour d'inoculation. Ces étapes ont été effectuées 2 fois, la première préparation a permis d'obtenir les inoculums des 3 premiers jours d'inoculation, la seconde préparation les inoculums des jours 4 à 6. Les inoculums ont été conservés à 5+/-3°C et le titrage a été effectués avant inoculation afin de s'assurer que la conservation à 5+/-3°C n'avait pas affecté la concentration bactérienne.

Lors de la deuxième expérimentation, deux concentrations différentes du probiotique *E. coli* ED1a ont été testées. La concentration la plus faible a été obtenue comme décrit précédemment. La forte concentration du probiotique *E. coli* ED1a a été réalisée de la façon suivante :

La souche a été repiquée sur une gélose de MH. Après 24 heures d'incubation à 37°C ± 2°C, 3 tubes de suspension de la culture ont été ajustés à une densité optique égale à 1 Mac Farland. Ces trois tubes ont été regroupés et 10 ml ont été prélevés et ajouté à 990 ml de bouillon Mueller Hinton (Biorad). Cette suspension a été ensuite incubée 18 heures à 37°C ± 2°C sous agitation. La culture bactérienne a été ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 3500 g. Le culot obtenu a été suspendu dans 100 ml d'eau peptonnée tamponnée. Le titrage des suspensions bactériennes a été réalisé par des dilutions en cascade au dixième de la suspension finale jusqu'à la dilution 10^{-10}. Cent µl des dilutions 10^{-6} à 10^{-10} ont été ensemencés sur gélose de MH à raison de 3 boîtes par dilution. Pour la détermination du titre de la suspension bactérienne, les boîtes contenant une centaine de colonies ont été retenues et une moyenne des trois boîtes a été faite. Cette moyenne a été ensuite multipliée par le facteur de dilution et ramenée en litre, de façon à obtenir des UFC/l.

2- Les protocoles expérimentaux

Après approbation des protocoles par le comité d'éthique (Cometh saisine 12-032), nous avons réalisé trois essais sur des porcs EOPS. Pour les trois essais, des pesées et l'observation des symptômes ont été effectués tout au long des expérimentations. Des autopsies permettant l'observation éventuelle de lésions au niveau des organes ont été également réalisées à la fin des trois essais. Le nombre d'animaux a été choisi en fonction de la capacité des animaux.

2-1 Premier essai expérimental

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si l'administration de la souche *E. coli* ED1a permet de s'opposer à la multiplication et à la persistance des souches *E. coli* R-C3G dans le microbiote intestinal des porcs. Vingt-quatre porcs EOPS âgés de huit semaines sont répartis de manière aléatoire dans trois animaleries. Le dispositif expérimental est décrit dans le tableau 12. Deux parcs de 4 porcs sont disposés dans chaque animalerie.

Tableau 12: Protocole expérimental de l'essai 1

Animalerie	1	2	3
Traitement	8 porcs témoins	8 porcs *E. coli* multirésistant M63 + *E. coli* ED1a	8 porcs *E. coli* multirésistant M63

Dans l'animalerie 1, huit porcelets ont reçu de l'eau peptonnée tamponnée stérile (10 ml) par voie orale à J0. Pour les animaleries 2 et 3, tous les porcelets ont été inoculés par voie orale, à J0 avec 10 ml de la suspension de la souche *E. coli* M63. De J8 à J13, 10 ml d'une suspension de la souche d'*E. coli* ED1a ont été administrés quotidiennement par voie orale aux porcelets des animaleries 2 et 3.
Des prélèvements individuels de matières fécales et des prélèvements de lisier (mélange de matières fécales et d'urine émis pendant une semaine et recueillis à l'aide d'un bac placé sous chaque parc) ont été effectués. Ces échantillons de lisier ont été stockés à +4°C en flacons de verre de 0,25 litre, fermés et des prélèvements de ces échantillons ont été collectés après une semaine, deux semaines, un mois et deux mois de stockage. Les différentes étapes de cette expérimentation sont décrites dans la figure XII.

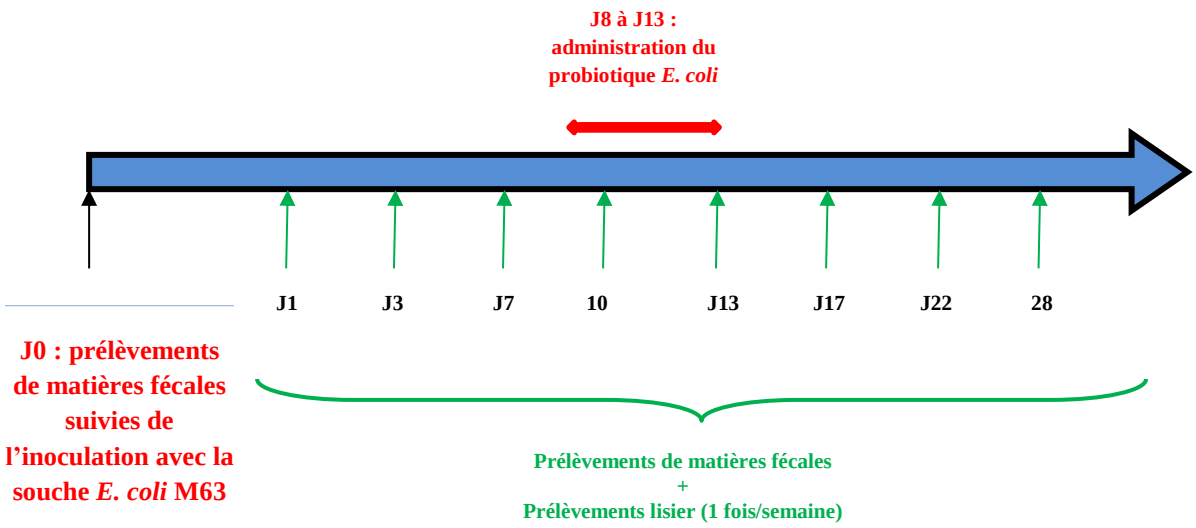


Figure XII: Calendrier expérimental de l'essai 1

2-2 Deuxième essai expérimental

Un deuxième essai a été réalisé afin de confirmer les résultats du précédent essai concernant la capacité d'*E. coli* ED1a à réduire le portage de souches résistantes aux C3G. Un effet dose de la souche *E. coli* ED1a a été également testé. Trente-quatre porcs EOPS âgés de huit semaines ont été répartis dans quatre animaleries. Le dispositif expérimental est décrit dans le tableau 13. Chaque animalerie était séparée en deux parcs.

Tableau 13: Protocole expérimental de l'essai 2

Animalerie	B1	B2	B3	B4
Traitement	6 porcs témoins	8 porcs + *E. coli* multirésistant M63	10 porcs + *E. coli* multirésistant M63+ *E. coli* ED1a (faible dose)	10 porcs + *E. coli* multirésistant M63 + *E. coli* ED1a (forte dose)

Dans l'animalerie B1, six porcelets ont reçu de l'eau peptonnée tamponnée stérile (10 ml) par voie orale à J0. Pour les animaleries B2, B3 et B4, tous les porcelets ont été inoculés par voie orale, à J0 avec 10 ml de la suspension de la souche *E. coli* M63. De J8 à J13, 10 ml d'une suspension de la souche d'*E. coli* ED1a ont été administrés quotidiennement par voie orale aux porcelets de l'animalerie B3 et B4.

Les animaux de l'animalerie B3 ont reçu une plus faible dose de la souche ED1a que les animaux de l'animalerie B4. Comme dans le 1er essai, des prélèvements individuels de matières fécales et des prélèvements de lisier ont été effectués (figure XIII).

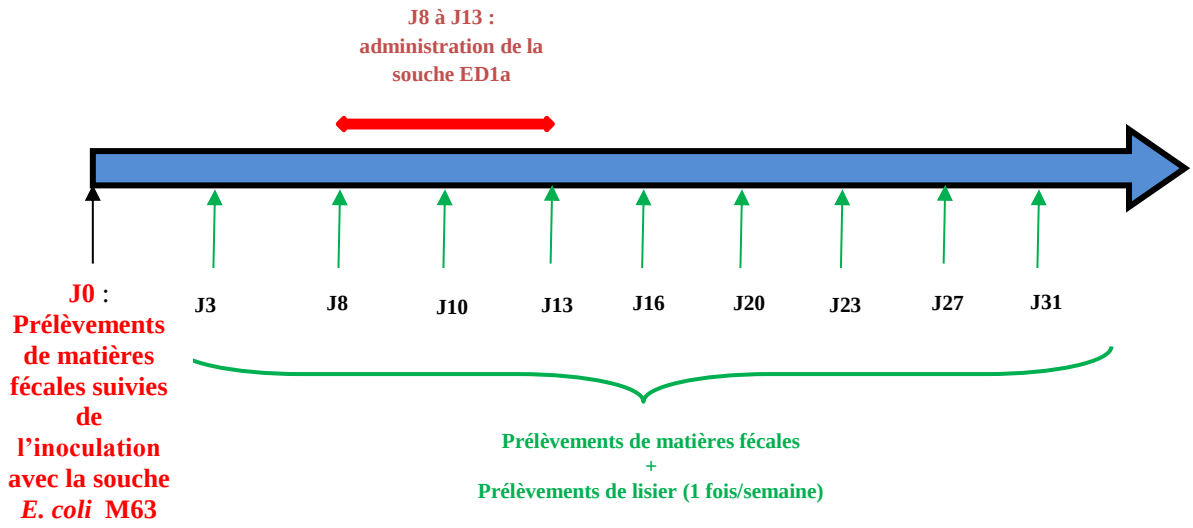


Figure XIII: Calendrier expérimental de l'essai 2

Les échantillons de lisier collectés à ces différentes dates ont été stockés à température ambiante en flacon de verre de 0,25 litre et des échantillons de ces prélèvements ont également été réalisés après une semaine, deux semaines, un mois et deux mois de stockage. Le stockage à température ambiante permet de mieux représenté des conditions du terrain.

2-3 Troisième essai expérimental

Un troisième essai a été effectué dans le but de comparer l'efficacité de deux « probiotiques » (*E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle) vis-à-vis de l'excrétion de souches R-C3G, soit *E. coli* M63, soit *E. coli* TN03, une souche pathogène d'origine humaine, porteuse de $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$. Cinquante-six porcs EOPS âgés de huit semaines ont été répartis dans sept animaleries. Le dispositif expérimental est décrit dans le tableau 14.

Tableau 14: Dispositif expérimental de l'essai 3

Animalerie	F1	F2	F 3	B1	B2	B3	B4
Traitement	6 porcs témoins	5 porcs + *E. coli* ED1a	5 porcs + *E. coli* Nissle	5 porcs *E. coli* multirésistant M63 puis *E. coli* ED1a	5 porcs *E. coli* multirésistant M63 puis *E. coli* Nissle	5 porcs *E. coli* TN03 puis *E. coli* ED1a	5 porcs *E. coli* TN03 puis *E. coli* Nissle

A J0, les animaux des animaleries B1 et B2 ont été inoculés avec 10 ml de la souche *E. coli* M63 et les animaux des animaleries B3 et B4 ont reçu 10 ml de la souche *E. coli* TN03. Dans l'animalerie F1, 6 porcelets ont reçu de l'eau peptonnée tamponnée stérile. De J8 à J12, les porcelets ont reçu 10 ml par jour de la suspension de la souche *E. coli* ED1a ou de la souche *E. coli* Nissle par voir orale. Des prélèvements individuels de matières fécales ont été réalisés à J0 avant les inoculations et à différentes dates. Les différentes étapes de cet essai sont présentées dans la figure XIV.

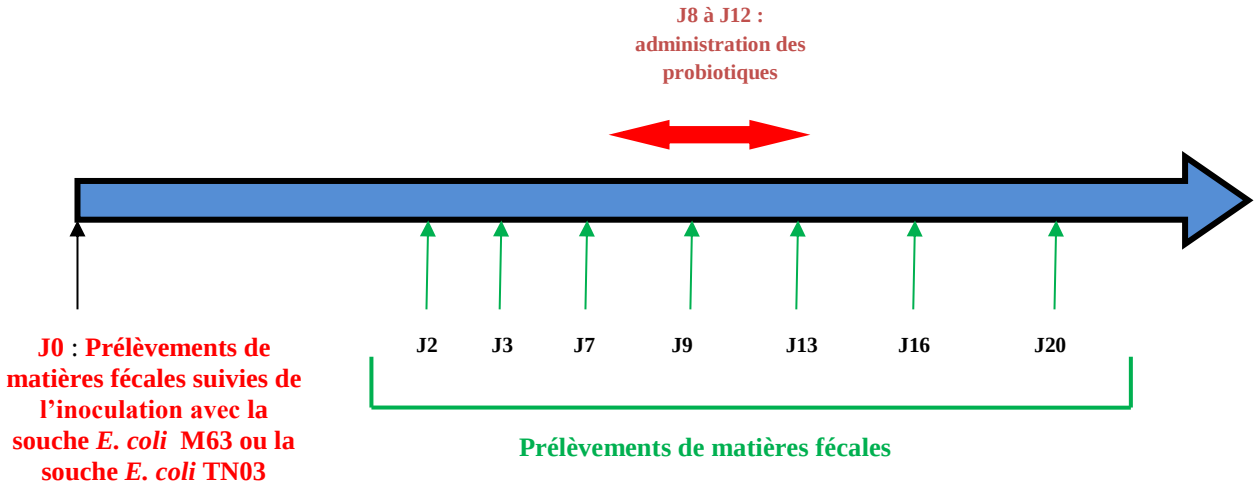


Figure XIV: Calendrier expérimental de l'essai 3

2-4 Conservation des prélèvements

Pour chaque prélèvement de matières fécales et de lisier, deux échantillons de 1 g ont été refroidis dans l'azote puis stockés à -70°C. Ces prélèvements ont permis la détermination du nombre d'entérobactéries R-C3G dans les prélèvements de fécès et de lisier.

En parallèle, 0,25 mg de matière fécale et de lisier ont été conservés à -20°C. Ces échantillons ont permis la quantification des *E. coli* totaux, *E. coli* ED1a, *E. coli* Nissle 1917 et du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$.

IV- Dénombrement, caractérisation et conservation des entérobactéries CTX^R

1- Dénombrement des entérobactéries CTX^R

Après décongélation, les échantillons de 1g de fécès ou de lisier des animaux inoculés à l'aide d'*E. coli* M63 ont été dilués dans 9 ml d'eau physiologique stérile. Des dilutions décimales en cascade ont été ensuite réalisées jusqu'à la dilution 10^{-3}. Pour chaque porc, les dilutions 10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3} ont été ensemencées en triplicats sur géloses Mac Conkey (MC) (OXOID) + 2mg/l de CTX (Sigma Aldrich). L'ensemencement a été réalisé par un dépôt de 100µl sur la gélose puis l'étalement a été réalisé grâce à des billes de verres (VWR, Strasbourg, France). Les boîtes ont été incubées 24h à 37°C ± 2°C. Le nombre de colonies comptées sur les boites contenant un nombre de colonies compris entre 0 et environ 350 colonies ont été reportés sur un fichier Excel.

Pour les prélèvements réalisés avant les inoculations ou sur animaux non inoculés avec la souche M63, seuls des étalements à l'oese des échantillons non dilués ont été effectués sur gélose MC + 2 mg/l de CTX. Suite au dénombrement, pour chaque porc et pour chaque date, cinq colonies ayant poussé sur gélose MC + 2 mg/l de CTX ont été repiquées sur gélose MC + 250 mg/l de Rif. Les boîtes ont été incubées 24h à 37°C ± 2°C. Après incubation, le résultat (croissance ou non sur milieu supplémenté en Rif) a été noté.

2- Lysat cellulaire et conservation des entérobactéries CTX^R

Des lysats cellulaires et conservations des souches R-C3G et sensibles ou non à la rifampicine ont été préparés. Le mode opératoire utilisé pour les lysats et la conservation est décrit dans le tableau 15.

Tableau 15: Protocole de la préparation cellulaire et la conservation d'un isolat

Préparation du lysat cellulaire	- Récupérer quelques colonies dans 200µl de lyse A (Tris HCl 1M pH 8, MgCl2 25 mM , KCl 1M) + 200 µl de lyse B (Tris HCl 1M pH 8, MgCl2 25 mM, Tween 20 %, Triton 1X, Nonidet 0.4%, protéinase K 20 mg/ml) - Incuber 1 heure à 60°C - Incuber 15min à 95°C - Conserver les lysats à -20°C
Conservation	- Remplir les cryotubes de 1 à 1,5ml d'une solution d'eau peptonnée tamponnée avec 20% de glycérol - Racler à l'oese toutes les colonies d'une même souche - Introduire dans le cryotube préalablement préparé, le contenu de l'oese puis homogénéiser - Conserver à -70°C

3- Caractérisation des souches

Plusieurs tests PCR ont été utilisés pour l'identification et la caractérisation des souches CTX^R et Rif^R ou CTX^R et Rif^S conservées précédemment. Après confirmation de l'appartenance à l'espèce *E. coli*, la présence du gène bla_{CTX-M} du groupe 1 a été recherchée. Les groupes phylogénétiques de souches *E. coli* M63, *E. coli* TN03, *E. coli* ED1a, *E. coli* Nissle 1917 et des isolats CTX^R et Rif^S ont été déterminés et comparés. Les souches *E. coli* CTX^R et Rif^S appartenant au même groupe phylogénétique que les souches *E. coli* ED1a ou *E. coli* Nissle 1917 isolées d'animaux provenant des animaleries dans lesquelles « les probiotiques » avaient été inoculés ont été analysées par PCR afin de vérifier qu'il ne s'agissait pas des souches *E. coli* Nissle 1917 ou *E. coli* ED1a devenues résistantes aux C3G. Lors du dernier essai, les souches *E. coli* CTX^R isolées chez les porcs ayant reçu la souche *E. coli* TN03 ont été testées à l'aide de la PCR spécifique du clone *E. coli* O25b :H4-ST131.

Enfin, les profils génétiques de certains isolats ont été comparés par électrophorèse en champ pulsés après digestion par l'enzyme de restriction *Xba*I.

3-1 PCR d'identification *Escherichia coli*

3-1-1 PCR spécifique d'*Escherichia coli*

Les souches collectées lors du 1er essai ont été identifiées par la PCR *Escherichia coli* (Bej et al. 1991*)*. Les amorces (Eurobio, Courtaboeuf, France) utilisées lors cette PCR permettent d'amplifier le gène *uid*A codant pour l'enzyme β-glucuronidase et le gène *ipa*H qui est porté par l'ensemble des quatre espèces de *Shigella*, ainsi que par les *E. coli* entero-invasifs (EIEC).Les séquences nucléotidiques de différentes amorces utilisées pour cette PCR ainsi que la taille des produits amplifiés sont décrites dans l'annexe 1. Le protocole de cette PCR est présenté dans un tableau récapitulatif présent dans l'annexe 3.

3-1-2 PCR spécifique d'*Escherichia coli* en temps réel

Les souches collectées lors du deuxième et troisième essai ont été identifiées par PCR en temps réel (Furet *et al.* 2009). Cette PCR est dirigée sur le gène codant pour l'ARN 16S d'*E. coli*. Les séquences nucléotidiques du couple d'amorces (Eurobio) et de la sonde (Sigma Aldrich) nécessaires à la réalisation de cette PCR sont présentées dans l'annexe 2. Les différents paramètres et le protocole sont décrits dans le tableau récapitulatif de l'annexe 4.

3-2 PCR spécifique de la souche *E. coli* TN03

Lors du dernier essai, les souches d'*E. coli* CTX^R, Rif^S isolées à partir de matières fécales de porcs inoculés avec la souche *E. coli* TN03 ont été vérifiées avec cette PCR (Clermont *et al.* 2013). Il s'agit de savoir si les isolats appartiennent à la souche *E. coli* TN03 ou s'il y a eu transfert du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$. La souche *E. coli* TN03 appartient au clone *E. coli* O25b :H4-ST131, la PCR cible le gène *rfb* codant pour l'antigène O25b. Les séquences nucléotidiques de différentes amorces utilisées pour cette PCR ainsi que la taille du produit amplifié sont décrites dans l'annexe 1.Les différents paramètres et le protocole sont décrits dans le tableau récapitulatif présenté dans l'annexe 3.

3-3 PCR de détection du gène $bla_{CTX\text{-}M}$ du groupe 1

3-3-1 PCR classique des gènes $bla_{CTX\text{-}M}$

Cette PCR multiplexe spécifique a permis la détection des différents groupes des gènes $bla_{CTX\text{-}M}$ (Woodford *et al.* 2006). Cette PCR a été utilisée pour confirmer la présence d'un gène du groupe $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ à partir des souches récoltées lors du 1er essai. Le protocole de cette PCR est détaillé dans un tableau récapitulatif présenté dans l'annexe 3.

Les séquences nucléotidiques de différentes amorces utilisées pour cette PCR ainsi que la taille des produits amplifiés sont décrites dans l'annexe 1.

3-3-2 PCR en temps réel spécifique du gène *bla*$_{CTX-M-1}$

Cette PCR (Ellem *et al.* 2011) en temps réel a été utilisée pour vérifier que les souches CTX^R possèdent bien un gène *bla*$_{CTX-M}$ du groupe 1 lors de l'analyse de souches récoltées au cours du deuxième et du troisième essai. Les séquences nucléotidiques du couple d'amorces (Eurobio,) et de la sonde (Sigma Aldrich,) nécessaires à la réalisation de cette PCR sont présentées dans l'annexe 2. Le protocole est décrit dans un tableau récapitulatif présenté dans l'annexe 4.

3-4 PCR de détection des probiotiques

Ces tests PCR ont été utilisés pour les souches *E. coli* CTX^R et Rif^S appartenant au même groupe phylogénétique de la souche *E. coli* ED1a ou de la souche *E. coli* Nissle 1917 isolées dans les animaleries où les porcs avaient été inoculés avec un probiotique. Ces PCR ont pour but de montrer la présence ou l'absence de transfert du gène *bla*$_{CTX-M}$ du groupe 1 vers les probiotiques.

Pour la PCR en temps réel spécifique d'*E. coli* ED1a, nous avons utilisé les amorces et les sondes dessinées par Isabelle Kempf ciblant un élément conjugatif intégratif spécifique de la souche *E. coli* ED1a. Le fluorophore FAM de la sonde spécifique d'*E. coli* ED1a a été choisi. Les séquences des amorces et de la sonde sont décrites dans l'annexe 2. Le protocole mis en place pour cette PCR est décrit dans le tableau récapitulatif présenté dans l'annexe 4. La PCR spécifique *E. coli* Nissle 1917 a été utilisée seulement lors du troisième essai, nous avons utilisé les amorces et les sondes décrites par Christine Miossec (Da Volterra, Paris). Le fluorophore CY5 de la sonde spécifique d'*E. coli* Nissle a été choisi. Les séquences des amorces et de la sonde sont décrites dans l'annexe 2 et le protocole expérimental est présenté dans le tableau récapitulatif (Annexe 4).

3-5 Typage phylogénétique pour *E. coli*

Les souches *E. coli* CTX^R et Rif^S collectées pendant les trois essais ont été testées selon le typage phylogénétique décrit par Clermont *et al* (Clermont *et al.* 2013). Cette PCR permet de déterminer le groupe phylogénétique des souches CTX^R et Rif^S et d'étudier ainsi la diffusion de la résistance vers ces différents groupes. Cette PCR permet l'identification des sept phylo-groupes reconnus pour *E. coli* : A, B1, B2, C, D, E, F. Le principe de cette PCR a été décrit dans le paragraphe I-3 (page 8). Les différentes séquences nucléotidiques nécessaires à la détermination des groupes phylogénétiques des isolats sont décrites dans le tableau 16.

Tableau 16: Séquences nucléotidiques des différentes amorces et la taille des produits amplifiés pour le typage phylogénétique

Nom	séquence	Nom	séquence	Taille du produit amplifié
chuA.1b	5'ATGGTACCGGACGAACC AAC 3'	**chuA.2**	5'TGCCGCCAGTACCAAA GACA3'	288 pb
Yja.1b	5'CAAACGTGAAGTGTCAG GAG3'	**Yja.2b**	5'AATGCGTTCCTCAACCT GTG3'	211 pb
TspE4C2. 1b	5'CACTATTCGTAAGGTCA TCC3'	**TspE4C2 .2b**	5'AGTTTATCGCTGCGGGT CGC3'	152 pb
AceK.f	5'AACGCTATTCGCCAGCT TGC3'	**ArpA1.r**	5'TCTCCCCATACCGTACG CTA3'	400 pb

Les réactions ont été effectuées dans des mélanges PCR de 23 µl contenant 1,7 µM des amorces AceK.f et ArpA1.r (Eurobio, Courtaboeuf, France), 0,9 µM pour les autres amorces, 0,2 mM de dNTP, 1X du tampon Green Go Taq Flexi (Promega, Charbonnières, France), 1X $MgCl_2$ Flexi (Promega, Charbonnières, France) et 1,25 UI de Go Taq polymérase Flexi (Promega, Charbonnières, France) et 3 µl d'ADN. Le protocole de cycle thermique débute par une activation de l'ADN Taq polymérase à 94°C pendant 5 min, ensuite 30 cycles ont été effectués à 94°C pendant 5 secondes, 59°C pendant 20 secondes avant une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Un témoin négatif a été également inclus (23µl de mix et 2 µl d'eau DNAfree (Eurobio, Courtaboeuf, France)).

Les souches témoins utilisées lors de cette PCR étaient *E. coli* 11F002475 spe A, Goren spe A ou C, *E. coli* 12F001836 spe B1, *E. coli* 12F000373 spe Clade I ou E (UMB), *E. coli* 5000196 spe B2, *E. coli* 5010622 spe B2, 121 spe D, 114 spe D, *E. coli* 12F002298 spe F, ROAR 185 Clade I, ROAR 19 Clade II, ROAR 438 Clade III, B 49 Clade IV, ROAR 43 Clade V, ECOR 70 Groupe C, ECOR 37 Groupe E, ECOR 40 Groupe F, *E. albertii* et *E. fergusonii*. Les souches témoins ont été fournies par O. Clermont (INSERM Paris).
Suite à cette réaction PCR, les amplicons ont été déposés sur gel d'agarose à 2%. Une migration a été effectuée pendant 90 min à 150 volts. Une coloration dans du Bromure d'éthidium (BET) (Eurobio, Courtaboeuf, France) a été ensuite réalisée pendant 30 minutes et la lecture du gel a été réalisée sous UV. Le tableau 1 présenté dans l'annexe 5 permet d'interpréter les résultats. Pour la détermination du groupe A, C, D ou E, d'autres tests PCR sont nécessaires. Les séquences nucléotidiques et les conditions opératoires ont été présentées dans le tableau 2 de l'annexe 3. Les séquences nucléotidiques et la taille des amplicons permettant l'identification des groupes phylogénétiques A ou C sont issus de la modification de la publication d'O. Clermont (Clermont *et al.* 2013) et O. Clermont (communications personnelles).

3-6 Electrophorèse en champ pulsé

Cette technique (Ribot *et al.* 2006) nous a permis de comparer certaines de nos souches CTX^R et Rif^S par rapport à la souche *E. coli* M63 et/ou aux probiotiques. Toutes les souches *E. coli* analysées par électrophorèse en champ pulsé (ECP) ont été repiquées sur gélose Mueller Hinton (Biorad) et incubées 24h à 37°C ± 2°C.

Quelques colonies ont été déposées dans 1ml de tampon CBS pH 8 (100 mM Tris pH 7,6 et 100 mM EDTA), La densité optique de la suspension cellulaire a été ajustée entre 1,3 et 1,6 à une longueur d'onde de 600 nm. Vingt µl de protéinase K (Eurobio, Courtaboeuf, France) ont été ajoutés à 400 µl de la suspension bactérienne. Ce mélange a été lui-même ajouté à 400 µl de SDS/agarose en TE préalablement mis en surfusion à 50°C. Ce mélange final a été déposé dans des moules et laissé solidifier pendant 10 à 15 minutes.

Ensuite une lyse cellulaire a été effectuée par l'ajout de 3 ml de la solution de lyse (Tris 1M pH 7,6, EDTA 250 mM pH8, Sarcosine 10%, protéinase K (20 mg/ml)). Les inserts et la solution de lyse ont été incubés 2h sous agitation à 54°C ± 1°C. Suite à cette incubation, plusieurs étapes de lavage ont été réalisées. Après avoir éliminé la solution de lyse, 10 ml d'eau distillée stérile préalablement chauffée à 50°C ont été déposés et incubés à 50°C ± 2°C sous agitation pendant 10 minutes. Cette étape a été répétée une fois.

Trois lavages à l'aide de TE pH 8 (EDTA 0,5M pH8, Tris 1M pH8) ont été ensuite effectués : 8 ml de TE stérile chauffé à 50°C ont été ajoutés aux inserts et ont été incubés à 50°C ± 2°C sous agitation pendant 15 minutes. Les inserts ont été conservées à +4°C dans 5 ml de TE pH8.Une digestion enzymatique a été réalisée grâce à l'enzyme *Xba*I (Fermentas, Illkirch, France). Un insert a été ajouté à 100 µl du mélange enzymatique (Tampon 10X, Enzyme *Xba*I eau stérile). Les tubes ont été incubés 5h à 37°C ± 1°C. Suite à cette digestion, les inserts ont été lavés avec du TE pH8 et ont été conservés à +4°C. La séparation des fragments d'ADN a été réalisée par électrophorèse dans un gel d'agarose (Eurobio, Courtaboeuf, France) à 1%. Le programme utilisé a été le suivant :

- 6 volts/cm
- angle : 120°
- Temps initial : 2 secondes
- Temps final : 64 secondes
- Temps de migration : 25 heures

A la fin de la migration, l'ADN a été révélé par coloration au Bromure d'Ethidium (Eurobio) et la lecture a été effectuée sous UV.

V- Quantification des *E. coli* totaux, *E. coli* ED1a, *E. coli* Nissle et du gène $bla_{CTX-M-1}$

1- Extraction d'ADN

Après décongélation des prélèvements de matières fécales et/ou de lisier, l'extraction d'ADN a été réalisée en deux étapes. La première étape consiste à extraire l'ADN grâce à une extraction mécanique couplée à une extraction chimique. La deuxième étape consiste à purifier l'ADN grâce à un robot (M48, Qiagen) utilisant la technologie des billes magnétiques (Yu & Morrison 2004).

Dans un premier temps, 400 mg de billes de verre (de 0,25 à 0,5 mm) (VWR) et 1 ml de solution de lyse (500mM NaCl, 50mM Tris-HCl à pH 8, 50 mM EDTA, 4% de SDS et de l'eau) ont été ajoutés à 250 mg de matières fécales ou de lisier. Une lyse mécanique a été effectuée pendant 3 minutes à une fréquence de 30 Hz (Tissue Lyser, Qiagen). Les échantillons ont été ensuite incubés 15 minutes sous agitation à 70°C.

A la suite de cette incubation, les échantillons ont été centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à 16000 g et le surnageant a été récupéré dans des tubes préalablement déposés dans la glace. L'étape précédemment décrite a été répétée à l'exception du volume de tampon de lyse introduit, 300 µl de tampon de lyse ont été déposés dans les échantillons au lieu du 1 ml. Une fois la totalité du surnageant récupérée, une tablette permettant l'adsorption des inhibiteurs a été introduite (tablette Inhibitex, Qiagen, Courtaboeuf, France). Après 1 minute d'incubation, les échantillons ont été vortexés pendant 1 minute. A la suite d'une centrifugation à 4°C pendant 3 minutes à 16000 g, le surnageant a été récupéré.

Une seconde lyse chimique a été réalisée grâce à l'ajout de 15 µl de protéinase K (20mg/ml) (Qiagen, Courtaboeuf, France). Cette enzyme a été activée à 56°C pendant 30 minutes. Enfin, 200 µl des échantillons ont été prélevés et déposés dans des tubes adaptés au robot d'extraction. La purification de l'ADN a été réalisée grâce à un kit (Kit Mag Attract M48, Qiagen, Courtaboeuf, France) adapté au robot d'extraction M48 (Qiagen). L'ADN purifié a été ensuite dosé au Nanodrop (Thermoscientific). Les échantillons d'ADN issus des prélèvements de fécès ont été ajustés à 10 ng d'ADN/µl. Par contre, compte tenue de la faible concentration en ADN, les échantillons de lisier n'ont pas été ajustés à 10 ng d'ADN/µl. Les ADN ont été stockés à +4°C avant d'être testés en PCR quantitative.

2- Quantification des *E. coli* totaux, de la souche *E. coli* ED1a et de la souche *E. coli* Nissle

2-1 Construction des gammes étalon avec de l'ADN purifié

Chaque souche a été cultivée sur gélose MH (Biorad). Après 24h d'incubation à 37°C ± 2°C, un lysat d'ADN a été réalisé sur la souche comme décrit dans le paragraphe IV-2 (page 41). L'ADN a ensuite été purifié sur colonne de silice Qiagen (QiaAmp DNA kit) (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Puis la solution d'ADN a été dosée au spectrophotomètre (Nanodrop). Une lecture a été faite à 260 nm afin de doser l'ADN et une lecture a été faite à 280 nm afin de doser les protéines résiduelles (le rapport DO 260 nm/DO 280 nm doit être compris entre 1,8 et 2). L'ADN a été ensuite aliquoté et conservé à -20°C. Lors de chaque PCR, un tube d'ADN a été décongelé et des dilutions de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10^{-7} ont été réalisées.

2-2 Les amorces et les sondes des PCR quantitative

Les amorces et les sondes utilisées pour la quantification des *E. coli* totaux, de la souche *E. coli* ED1a et la souche *E. coli* Nissle ont été décrites dans l'annexe 2.

2-3 Protocole des PCR quantitative

Chacun des mélanges réactionnels a été réalisé dans les conditions précédemment décrites dans l'annexe 4, à l'exception de l'ajout d'un contrôle interne (1X du mix IPC et 0,25 X ADN IPC) (Applied Biosystem, Illkirch, France) permettant la validation des résultats.

3- Quantification du gène $bla_{CTX-M-1}$

3-1 Clonage du gène $bla_{CTX-M-1}$

Le clonage de ce gène a été réalisé dans le but de connaitre exactement la quantité de plasmide dans la gamme. Dans un premier temps, des amorces permettant l'amplification du gène cible ont été déterminées. Pour cela, les séquences nucléotidiques du gène d'intérêt ont été téléchargées à partir de la base de données GenBank (http://www.ncbi.nih.gov/) à partir de la référence Genbank n° X92506.1. Ces séquences ont été ensuite alignées via le programme Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) afin de créer pour chaque gène une séquence consensus qui a permis la conception des amorces. Les amorces ont été définies avec le programme Primer 3 (http://primer3.ut.ee/) de manière à encadrer la plus longue partie de l'ORF des gènes cibles.
Enfin, la spécificité des amorces a été vérifiée par l'outil d'alignement BLAST (http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/) ainsi qu'avec le programme de PCR en ligne InSilico (http://insilico.ehu.es/). Les séquences nucléotidiques ont été décrites dans le tableau 17.

Tableau 17: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour le clonage du gène $bla_{CTX-M-1}$

Nom des séquences	Séquences nucléotidiques
CTX_M1_for	5’ ACTGGCGCCTCCCATGGTTAAA 3’
CTX_M1_rev	5’TCACATATGGCTATTACAAACCGTT 3’

Dans un second temps, l’amplification du gène d’intérêt a été réalisée par PCR à partir de la souche *E. coli* M63. Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 50 µl contenant 1 µl de dNTP à 10 nM, 2µl d’amorces à 10 µM, 1.5 µl de $MgCl_2$ à 50 mM, 5µl de tampon 10X, 0.2 µl de Taq Platinium à 5U/µl (Invitrogen, Illkirch, France), 35,2 µl d’eau DNase free (Eurobio) et 5 µl d’ADN. La taille de l’amplicon a été vérifiée grâce à une migration sur gel d’agarose à 2%.

Dans un troisième temps, le clonage du produit PCR dans le vecteur TOPO TA a été réalisé avec le kit TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Pour cela, 4 µl du produit PCR ont été ajoutés à 2 µl de la solution S1 (pour une réaction : 1µl de solution saline + 1µl de vecteur PCR4-TOPO (figure XV)). Cette suspension a été mélangée doucement, incubée 5 minutes à température ambiante et ensuite placée dans la glace. 2µl de bactéries TOP10 chimio-compétentes ont été ajoutés. Ce mélange a été incubé 5 à 10 minutes dans la glace. Après un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes un transfert rapide dans la glace a été effectué. Une incubation d’une heure à 37°C a été réalisée après ajout du milieu SOC, un milieu optimal de croissance additionné de glucose et qui permet d’augmenter l’efficacité de la transformation. Finalement 50 µl du mélange ont été étalés sur milieu Mueller Hinton (Biorad) avec 50 mg/l d’ampicilline (Sigma Aldrich). Ces boites ont été incubées pendant 24 heures à température de 37°C ± 2°C. A la fin de l’incubation, 5 clones ont été repris et repiqués dans 5 ml de bouillon MH (Biorad). Ces suspensions ont été incubées 24 heures à 37°C± 2°C.

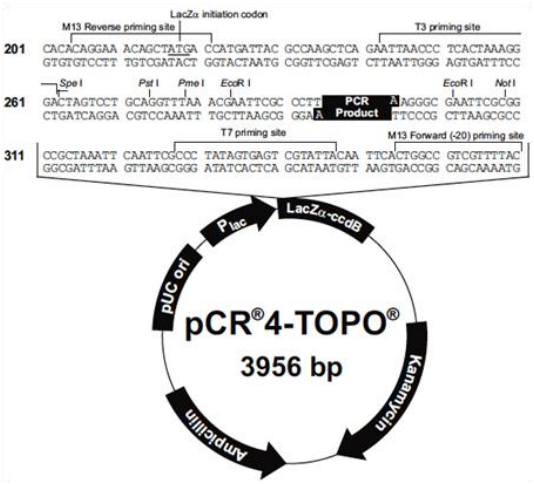


Figure XV: Caractéristiques du vecteur PCR4-TOPO et de la séquence entourant le site de clonage

Après 24 heures d'incubation, une extraction plasmidique des cinq clones a été réalisée grâce au kit Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Dans un premier temps, les suspensions bactériennes ont été centrifugées 30 secondes à 11000g. Le culot a été ensuite suspendu avec 250 µl de tampon A1 (Macheray-Nagel).

250 µl du tampon A2 (Macheray-Nagel, Hoerdt, France) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5 minutes. Une centrifugation a été effectuée pendant 5 minutes à 11000g après l'ajout de 300 µl de tampon A3 (Macheray-Nagel) (mélange par retournement). Un volume maximal de 750 µl a été déposé sur la colonne qui a été au préalable placée dans un tube de 2ml. Une centrifugation de 5 minutes à 11000g a été effectuée dans le but d'éliminer le filtrat. Ces deux dernières étapes peuvent être répétées si le volume de surnageant est supérieur à 750 µl. Un volume de 600 µl de tampon A4 (Macheray-Nagel) a été ajouté sur la colonne. Deux centrifugations ont été effectuées, la première a été réalisée pendant 1 minute à 11000g dans le but d'éliminer le filtrat. La deuxième a été effectuée à la même vitesse pendant 2 minutes permettant ainsi l'asséchement de la colonne. L'élution a été réalisée avec l'ajout de 50 µl du tampon AE (Macheray-Nagel).

Afin de vérifier la présence la présence du $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, les plasmides purifiés ont été séquencés. Les séquences obtenues ont vérifiées par l'outil d'alignement BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

3-2 Construction des gammes étalon avec le plasmide contenant le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$

La concentration en ADN plasmidique a été mesurée par le fluoromètre Qubit® (Invitrogen). Le nombre de copies de plasmides portant le gène d'intérêt a été déterminé grâce à la formule suivante :

$$\text{Nombre de copies/µl} = \frac{C \times 10^{-6}}{2 \times MM\ (dNTP) \times Taille} \times Na$$

C: µg/µl Taille du plasmide en pb $Na = 6{,}02.10^{23}$ MM (dNTP) = 330 Da

Des gammes de 1 à 1.10^{9} copies/µl ont été préparées et stockées à -20°C

Les amorces et les sondes de la PCR quantitative

Les amorces et les sondes utilisées pour la quantification de ce gène ont été décrites dans l'annexe 2.

Protocole de la PCR quantitative ciblant le gène $bla_{CTX-M-1}$

Le mélange réactionnel a été préparé dans les conditions décrites dans l'annexe 4. Le contrôle interne (1X du mix IPC et 0,25 X ADN IPC) (Applied Biosystem) n'a pas été ajouté, compte tenu du faible nombre (25cycles) de cette PCR qui ne permet pas l'amplification du contrôle interne.

VI- Outils informatiques et statistiques

Excel a été utilisé pour l'exportation et le traitement des données recueillies. La moyenne des valeurs de dénombrement d'entérobactéries CTX^R obtenues a été calculée et ramenée en log 10 par gramme de fèces ou par ml de lisier. Les quantités obtenues par PCR pour les différentes cibles bactériennes étudiées ont calculées en nombre copies/10ng d'ADN et ramenées en log 10.

Le logiciel R a été utilisé pour réaliser les analyses statistiques des différents essais. L'analyse statistique des gains de poids entre les différents lots a été déterminée par le test de Kruskal-Wallis. L'analyse statistique des résultats bactériologiques et moléculaires a été effectuée par le test Wilcoxon ou le test de Kruskal-Wallis. La distribution du nombre de résultats positifs a été comparée par le test de Fisher. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec la biostatisticienne Stéphanie Bougeard (Anses Ploufragan).

I- Caractéristiques des PCR quantitatives

Les nombres de copies d'*E. coli* totaux, *E. coli* ED1a, *E. coli* Nissle et du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ ont été déterminées par PCR quantitatives. Pour chaque PCR, la sensibilité et la spécificité de diagnostic, la spécificité analytique ainsi que la limite de détection ont été déterminées.

1- Détermination de la sensibilité (Se) et de la spécificité (Sp) diagnostiques de la méthode

L'analyse par PCR en temps réel des prélèvements de matières fécales collectés chez les porcs lors des expérimentations animales ou de cultures de bactéries autres que *E. coli* pour la qPCR *E. coli*, a permis de calculer la sensibilité et la spécificité de diagnostic des tests. Les résultats des différentes méthodes PCR développées sont rapportés dans le tableau 18. Le statut réel des échantillons pour les souches d'*E. coli* et le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a été déterminé par des tests en PCR classique (Résultats non montrés).

Tableau 18: Sensibilité (Se) et spécificité (Sp) diagnostiques des différentes méthodes PCR en temps réel

		qPCR *E. coli*		**qPCR *E. coli* ED1a**		**qPCR *E. coli* Nissle**		**qPCR $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$**	
		Statut réel de l'échantillon		**Statut réel de l'échantillon**		**Statut réel de l'échantillon**		**Statut réel de l'échantillon**	
		Positif	**Négatif**	**Positif**	**Négatif**	**Positif**	**Négatif**	**Positif**	**Négatif**
Réponse à la méthode	**Positif**	40	0	30	0	50	0	46	0
	Négatif	0	40	0	50	0	50	1	46
	Total	40	40	30	50	50	50	47	46
		Se : 100%	Sp : 100%	Se : 100%	Sp : 100%	Se : 100%	Sp : 100%	Se : 97,9%	Sp : 100%

La sensibilité de diagnostic est de 100% pour l'ensemble des PCR sauf celle permettant la détection du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ (97,9%). La spécificité de diagnostic est de 100% pour tous les tests PCR.

2- Limite de détection

La limite de détection d'une PCR (ou sensibilité analytique) est le plus petit nombre de copies d'ADN cible par unité de volume qui peut être détecté à partir de gamme passé 10 fois. Le tableau 26 récapitule l'ensemble des résultats pour les qPCR *E. coli*, *E. coli* ED1a, *E. coli* Nissle et le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. Pour les qPCR *E. coli* et *E. coli* ED1a, la limite de détection a pu être déterminée à partir de gammes de dilution de raison de 10 d'une solution d'ADN de la souche *E. coli* ED1a. La limite de détection pour la qPCR *E. coli* Nissle a été évaluée de la même façon à partir de la souche *E. coli* Nissle. Pour la qPCR blaCTX-M du groupe 1, la limite de détection a été déterminée à partir de gammes de dilution de raison de 10 d'une solution contenant le plasmide PCR4-TOPO contenant la copie clonée du gène d'intérêt, après avoir vérifié la construction par séquençage. Pour les trois PCR permettant la quantification de bactéries, la limite de détection a été ramenée en nombre de copies du gène recherché/µl. Pour cela, il faut tenir compte du nombre moyen de nucléotides dans 1fg d'ADN et du nombre de nucléotides de l'espèce bactérienne à quantifier. Sachant que $9{,}78 \times 10^5$ nucléotides représentent 1 fg (Dolezel *et al.* 2003), que la taille du génome de *E. coli* représente $4{,}64 \times 10^6$ nucléotides (NCBI Reference Sequence: NC_007779.1), une cellule d'*E. coli* représente donc environ 4,74 fg d'ADN. La taille des génomes des souches *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle représentent $5{,}2 \times 10^6$ nucléotides (NCBI Reference Sequence : NC_011745.1) et $5{,}4 \times 10^6$ nucléotides (NCBI Reference Sequence NZ_CP007799.1) respectivement ; l'ADN d'une cellule d'*E. coli* ED1a est donc estimé à 5,3 fg et une cellule d'*E. coli* Nissle 1917 à 5,56 fg.

Tableau 19: Détermination des limites de détection des qPCR *E. coli*, qPCR *E. coli* ED1a, qPCR *E. coli* Nissle et qPCR blaCTX-M groupe 1

	qPCR *E. coli* (40 cycles)			**qPCR *E. coli* ED1a (40 cycles)**			**qPCR *E. coli* Nissle (40 cycles)**			**qPCR CTX-M groupe 1 (25 cycles)**		
	concentration en fg/µL	**moyenne des Ct**	**écart-type des Ct**	**concentration en fg/µL**	**moyenne des Ct**	**écart-type des Ct**	**concentration en fg/µL**	**moyenne des Ct**	**écart-type des Ct**	**Nombre de copies/µl**	**moyenne des Ct**	**écart-type des Ct**
	$1,47 \times 10^{8}$	13,37	0,29	$1,47 \times 10^{8}$	15,42	0,21	$1,69 \times 10^{8}$	12,63	0,11	1×10^{6}	17,56	0,21
	$1,47 \times 10^{7}$	15,96	0,28	$1,47 \times 10^{7}$	18,88	0,15	$1,69 \times 10^{7}$	15,88	0,09	1×10^{5}	20,77	0,19
	$1,47 \times 10^{6}$	19,34	0,23	$1,47 \times 10^{6}$	22,36	0,26	$1,69 \times 10^{6}$	19,32	0,08	**1×10^{4}**	24,15	0,10
	$1,47 \times 10^{5}$	22,59	0,13	$1,47 \times 10^{5}$	25,64	0,09	$1,69 \times 10^{5}$	22,78	0,10	1×10^{3}	0,00	0,00
	$1,47 \times 10^{4}$	26,22	0,24	$1,47 \times 10^{4}$	28,93	0,18	$1,69 \times 10^{4}$	26,18	0,07	1×10^{2}	0,00	0,00
	$1,47 \times 10^{3}$	29,57	0,20	$1,47 \times 10^{3}$	31,90	0,26	$1,69 \times 10^{3}$	29,55	0,10	1×10^{1}	0,00	0,00
	$1,47 \times 10^{2}$	32,03	0,37	**$1,47 \times 10^{2}$**	35,10	0,68	$1,69 \times 10^{2}$	32,86	0,22			
	$1,47 \times 10^{1}$	0,00	0,00	$1,47 \times 10^{1}$	0,00	0,00	**$1,69 \times 10^{1}$**	36,11	0,40			
Limite de détection en nombres de copies/µl	**$1,47 \times 10^{2}$/4,74= 31 copies/µl**			**$1,47 \times 10^{2}$/5,3= 27,7 copies/µl**			**$1,69 \times 10^{1}$/5,56=3 copies/µl**			**1×10^{4}** copies/µl		

3- Spécificité analytique

La spécificité analytique des différentes PCR a été vérifiée à partir d'espèces bactériennes provenant de la même niche écologique contenant ou non des gènes de résistances. Le tableau 20 récapitule les résultats des différentes méthodes PCR mises au point pour ce projet. Pour *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle, aucune amplification n'a été observée avec 10 ng/µl d'ADN des 17 autres souches d'*E. coli* et des 4 autres genres bactériens testées. La PCR blaCTX-M du groupe 1 donne un résultat positif avec 10 ng/µl d'ADN d'une souche d'*E. coli* contenant le gène $bla_{\text{CTX-M-9}}$, tous les autres résultats étant négatifs. Les résultats de la PCR en temps réel *E. coli* indiquent une amplification (16 Ct) avec 10 ng/µl d'ADN d'une souche de *Shigella,* tous les autres résultats étant négatifs.

Tableau 20: Résultat de l'évaluation de la spécificité analytique

	Campylobater coli	*Campylobater jejuni*	*Enterococcus faecalis*	*Enterococus faecium*	*Salmonelle*	*Staphylocoque auréus*	*Acinetobacter baumanii*	*Klebsiella pneumonaea*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Shigella*	*E. coli* d'origine humaine (TN03)	*E. coli* Nissle	*E. coli* ED1a	*E. coli* d'origine porcine	*E. coli* contenant le gène bla_{CTXM-1}	*E. coli* contenant le gène bla_{CTXM-2}	*E. coli* contenant le gène bla_{CTXM-3}	*E. coli* contenant le gène bla_{CTXM-9}	*E. coli* contenant le gène $bla_{CTXM-28}$	*E. coli* contenant le gène bla_{TEM}	*E. coli* contenant le gène bla_{SHV}	*E. coli* contenant le gène bla_{CMY-2}	plasmide PCR4-TOPO + gène $bla_{CTX-M-1}$	Nombre de souches testées
qPCR *E. coli*	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) +	NT	NT	NT	× (13) -	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	× (1) -	**23**
qPCR CTX-M G 1	× (1) -	× (1) -	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	× (1) -	× (1) -	× (13) -	× (1) +	× (1) -	× (1) +	× (1) +	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	NT	**25**
qPCR *E. coli* ED1a	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	NT	NT	NT	NT	NT	NT	× (1) -	× (1) -	× (1) +	× (13) -	× (1) -	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	**21**
qPCR *E. coli* Nissle	× (1) -	× (1) -	× (1) -	× (1) -	NT	NT	NT	NT	NT	NT	× (1) -	× (1) +	× (1) -	× (13) -	× (1) -	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	**21**

× : souche testée ; (n) : nombre de souches testées ; - : absence d'amplification ; + : amplification ; NT : non testée

II- Préparation de la souche résistante : *E. coli* M63

Le protocole de préparation décrit a permis d'obtenir un *E. coli* transconjugant M63, appartenant au groupe phylogénétique B1, négatif vis-à-vis des antisérums spécifiques des principaux sérotypes pathogènes pour le porc (K85, K87, K88, K81, K82, F6(987P)). La souche *E. coli* M63 est résistante à la rifampicine, aux C3G, à la streptomycine et au triméthoprime-sulfaméthoxasole. Le séquençage du plasmide IncI1 a indiqué la présence des gènes $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{CMY\text{-}2}$, *sul2*, *aadA5* et *dfrA17*.

III- Résultats des protocoles expérimentaux

1- 1er Essai

Cet essai visait à étudier l'effet de l'administration du probiotique *E. coli* ED1a sur le portage intestinal d'*E. coli* R-C3G (souche *E. coli* M63).
Le titre de l'inoculum *E. coli* M63 était de 7,8 x 10^8 UFC/ml. Les titres des suspensions d'*E. coli* ED1a administrées de J8 à J10 étaient de 2,76 x 10^8 UFC/ml et de 6,03 x 10^8 UFC/ml de J11 à J13.

1-1 Symptômes et croissance des porcs

Des diarrhées ont été observées chez tous les porcs (8 porcs) inoculés seulement avec la souche *E. coli* M63 à J20 à J22 soit 7 semaines après le sevrage. L'analyse de prélèvements réalisée par le laboratoire vétérinaire de diagnostic (Labocea, Ploufragan) a indiqué la présence de Rotavirus. Une hyperthermie (41°C) a été observée chez un porc de l'animalerie 2 (M63) à J2, soit deux jours après l'inoculation de la souche *E. coli* M63. Les gains de poids des animaux sont présentés dans le tableau 21.

Tableau 21: Gains de poids moyens des animaux (kg) lors du 1er essai

Lot/Animalerie (n)	J0-J7	J7-J14	J14-J21	J21-J27	J0-J27
Témoins /Animalerie 1 (8)	6,7	6,8	5,8	6,7	26,0
M63 /Animalerie 2 (8)	6,2	6,7	4,8*	6,0	23,6
M63 puis ED1a/ Animalerie 3 (8)	6,2	6,1	7,0	6,3	25,6

***** Période pendant laquelle certains porcs de l'animalerie ayant reçu la souche *E. coli* M63 ont présenté de la diarrhée à Rotavirus.
(n) : nombre porcs/lot

Les gains de poids moyens des animaux sont présentés dans le tableau 28. Des différences significatives ont été observées de J0-J27 (P = 0.01) entre les trois lots.

Sur cette même période, le lot témoin avait un gain de poids significativement supérieur par rapport au lot inoculé avec la souche *E. coli* M63 ($P = 0.019$).

Les autopsies réalisées sur l'ensemble des porcs des trois animaleries n'ont montré aucune lésion au niveau des différents organes (poumon, cœur, reins, rate, foie).

1-2 Résultats d'analyses des matières fécales

1-2-1 Analyses bactériologiques des matières fécales

- Dénombrement des entérobactéries CTX^R

Le dénombrement des entérobactéries CTX^R a été réalisé sur les prélèvements de matières fécales des porcs présents dans les différentes animaleries.

Les prélèvements effectués à J0 dans les trois animaleries et dans l'animalerie témoin tout au long de l'essai ont montré l'absence d'entérobactéries CTX^R chez les porcs. Le nombre de porcs détectés positifs et les résultats du dénombrement d'entérobactéries CTX^R sont présentés dans le tableau 22.

Tableau 22: Moyennes en log 10 des entérobactéries isolées sur milieu Mac Conkey supplémenté avec 2 mg/l de CTX et nombre de porcs détectés positifs lors du 1er essai

Lot	J0 (n/t)	J1(n)	J3(n)	J7(n)	J10(n)	J13(n)	J17(n)	J22(n)	J28(n)
Témoins (A1)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)
M63 (A2)	0,00 (0/8)	6,05 (8/8)	3,90 (7/8)	2,87 (5/8)	4,17 (8/8)	4,67 (7/7)	4,47 (7/7)	4,35 (8/8)	2,76 (8/8)
M63+ED1a (A3)	0,00 (0/8)	3,43 (5/8)	3,53 (6/8)	3,68 (8/8)	3,30 (8/8)	3,25 (8/8)	4,07 (8/8)	3,06 (8/8)	3,34 (8/8)

A1 : Animalerie 1 ; A2 : Animalerie 2 ; A3 : Animalerie3; (n/t) : nombre de porcs détectés positifs/nombre de porcs testés

Nous avons observé l'excrétion d'entérobactéries CTX^R dans les deux lots (A2 et A3) dès le lendemain de l'inoculation avec la souche *E. coli* M63. Pour le lot (A2) n'ayant reçu que la souche *E. coli* M63, une diminution du nombre de porcs excrétant des entérobactéries CTX^R a été observée de J3 à J7, puis l'ensemble des porcs ont excrété des entérobactéries CTX^R jusqu'à la fin de l'essai. Pour le lot (A3) inoculé avec la souche *E. coli* M63 puis avec probiotique *E. coli* ED1a, le nombre de porcs excréteurs d'entérobactéries CTX^R était en augmentation jusqu'à J7 puis l'ensemble des porcs a été détecté positif et cela jusqu'à la fin de l'essai.

Lors de l'analyse des résultats, une différence sur le niveau d'excrétion d'entérobactéries CTX^R a été observé chez un porc de l'animalerie ayant reçu uniquement la souche *E. coli* M63 par rapport aux porcs de la même animalerie. En effet le porc (n° 4314) a été excrété

environ 1,3 à 2,1 log de plus que les autres animaux de la même animalerie, ce porc a été considéré comme un super-excréteur d'entérobactéries CTX^R.
Jusqu'à J8, les porcs des deux animaleries ont subi le même traitement (inoculation de la souche d'*E. coli* M63). Entre J1 et J7, il y avait environ 10^3 à 10^6 UFC d'entérobactéries CTX^R par gramme de fèces. Les écarts-types étaient importants et aucune différence significative n'a été notée entre les deux animaleries de J1 à J7.
L'analyse statistique permettant la visualisation de l'impact du probiotique *E. coli* ED1a a été réalisée sur les résultats obtenus à partir des prélèvements de J10 (premier prélèvement réalisé après le début du traitement avec le probiotique) à J28, soit en prenant en compte les résultats de tous les porcs soit en retirant le super-excréteur. En prenant en compte tous les animaux, nous avons noté une différence significative entre les lots pour la présence d'entérobactéries CTX^R (P = 0,01) pour l'ensemble de la période correspondante (de J10 à J28); l'analyse date par date a montré que la différence est significative seulement à J10 (P = 0,048) et une tendance à la différence est observée à J13 (P = 0,058), c'est-à-dire lors de l'administration du probiotique. L'administration du probiotique semble donc réduire significativement le nombre d'entérobactéries résistantes excrétées pendant la période d'administration. Cependant, en enlevant les résultats du porc super-excréteur, l'impact du probiotique parait moins significatif que précédemment (P = 0,087) sur l'ensemble de la période. L'analyse date par date a montré une tendance (P = 0,08 et P = 0,1) à J10 et J13.

- Caractérisation des entérobactéries CTX^R

Suite au dénombrement sur MC+CTX, 568 colonies, d'aspect caractéristique d'*E. coli* ont été repiquées sur milieu MC+CTX et sur milieu MC+Rif (le caractère de résistance à la rifampicine permet de suspecter que la souche isolée correspond à la souche inoculée d'*E. coli* M63).
87 souches se sont révélées CTX^R et Rif^S (15,3%) et 481 souches CTX^R et Rif^R (84,7%). Le Tableau 23 représente la répartition de ces souches par date de prélèvement et par animalerie.

Tableau 23: Pourcentage et nombre de colonies résistantes à la rifampicine parmi les colonies repiquées sur MC + Rif (1er essai)

Lot	J1 (n)	J3 (n)	J7 (n)	J10 (n)	J13 (n)	J17 (n)	J22 (n)	J28(n)
***E. coli* M 63 (A2)**	100,00% (40/40)	100,00% (29/29)	100,00% (17/17)	90,00% (36/40)	74,29% (26/35)	95,00% (38/40)	72,50% (29/40)	47,50% (19/40)
***E. coli* M63 + *E. coli* ED1a (A3)**	100,00% (25/25)	100,00% (22/22)	92,50% (37/40)	90,00% (36/40)	80,00% (32/40)	75,00% (30/40)	82,50% (33/40)	80,00% (32/40)

A2 : Animalerie 2 ; A3 : Animalerie 3 ; (n) : nombre de colonies Rif^R/nombre de colonies repiquées sur MC+Rif

Les souches d'entérobactéries CTX^R et Rif^S ont été détectées pour la première fois à J7 (lot M63+ED1a) ou à J10 (lot M63) et ont été observées jusqu'à J28.
Parmi les 568 isolats repiquées, 104 ont été conservés pour la caractérisation moléculaire dont les 87 isolats CTX^R et Rif^S (totalité des isolats CTX^R et Rif^S obtenu) et 16 isolats CTX^R et Rif^R (soit un isolat par date pour les lots A2 et A3). D'après les résultats obtenus avec la PCR basée sur le gène de la β-glucuronidase (*uid*A), 93 des 104 (89%) isolats ont été identifiés comme *E. coli* β-glucuronidase positifs. Cependant 11 isolats, de porcs n'ayant reçu que la souche *E. coli* M63 (1 à J22 et 10 à J28) se sont avérés négatifs pour cette PCR. Leur identification a été réalisée par la méthode Maldi-TOF au laboratoire vétérinaire de diagnostic (Labocéa, Ploufragan) et a indiqué qu'il s'agissait d'*E. coli*.
Les tests PCR spécifiques des gènes de groupes $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}8}$ et $bla_{CTX\text{-}M\text{-}25}$ ont montré que les 104 isolats d'*E. coli* C3G-R possédaient un gène du groupe $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ (Woodford *et al.* 2006).
L'analyse des groupes phylogénétiques déterminés par PCR (Clermont *et al.* 2013) a montré que les 104 isolats conservés d'*E. coli* se répartissaient dans 6 groupes phylogénétiques différents (Tableau 24). La souche d'*E. coli* M63 fait partie du groupe phylogénétique B1 et *E. coli* ED1a appartient au groupe phylogénétique B2. La détermination du groupe phylogénétique des 16 isolats CTX^R et Rif^R a montré leurs appartenances au groupe B1, comme la souche *E. coli* M63.

Tableau 24: Groupes phylogénétiques des 103 isolats d'*E. coli* (87 isolats Rif^S et 16 isolats Rif^R) (1er essai)

Groupe phylogénétique	A	B1	F	B2	C	E
Nombre de souches	4	57	25	1	1	15
pourcentage	3,80	55,30	24,30	1,00	1,00	14,60

Une ECP a été réalisée sur les 41 souches Rif^S et sur une souche Rif^R appartenant au groupe phylogénétique B1, et a révélé que les souches Rif^S présentaient un profil différent de la souche *E. coli* M63 et que la souche Rif^R présentait un même profil que la souche *E. coli* M63 (Gel non montré).
Une souche CTX^R et Rif^S appartenant au groupe phylogénétique B2 a été isolée chez un porc ayant reçu la souche *E. coli* M63 et le probiotique *E. coli* ED1a. Il a été vérifié par PCR que cette souche ne correspond pas à la souche *E. coli* ED1a, qui aurait acquis le gène de résistance $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$.

1-2-2 Analyses moléculaires des matières fécales

Le rendement moyen de l'ensemble des extractions réalisées à partir des matières fécales était de 109,5 ng/µl d'ADN, avec un minimum de 47,54 et un maximum de 156,3 ng d'ADN/µl. Pour faciliter l'analyse des résultats, chaque extraction d'ADN a été ajusté à 10 ng d'ADN/µl.

Les extraits d'ADN des matières fécales ont été ensuite analysés par qPCR afin de déterminer les quantités des cibles *E. coli*, *E. coli* ED1a et du gène de résistance $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. Dans le tableau 25, les moyennes sont exprimées en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN. Tous les porcs des trois animaleries ont été détectés positifs pour *E. coli* aux différentes dates, avec un titre moyen de 4,25+/- 0,52 log 10 copies d'*E. coli* pour 10 ng d'ADN.
Pour toutes les dates et tous les animaux du lot témoin et du lot M63 (A2) , les valeurs obtenues pour la détection d'*E. coli* ED1a étaient nulles, de même que les valeurs obtenues avant inoculation pour les porcs de l'animalerie 3 (lot M63 puis *E. coli* ED1a).
Les titres les plus élevés pour le probiotique *E. coli* ED1a ont été obtenus lors de la période d'administration (prélèvements de J10 et J13) ($P < 0,05$) par rapport à la période post-administration, mais plus de la moitié des animaux ont toujours été détectés porteurs d'*E. coli* ED1a lors des derniers prélèvements.
Les prélèvements obtenus des porcs témoins ou avant inoculation de la souche *E. coli* M63 sont négatifs vis-à-vis du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$. L'analyse statistique du nombre de copies du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ des animaux des animaleries 2 (lot M63 puis *E. coli* ED1a) et 3 (lot M63) ont montré qu'il y avait un effet significatif de l'administration du probiotique *E. coli* ED1a à J10 ($P = 0,003$), J13 ($P = 0,004$) et J17 ($P = 0,03$), avec significativement moins de copies du gène pour le lot 3 (lot M63 puis *E. coli* ED1a). En excluant le porc super excreteur présent dans le lot 2, une différence significative a été toujours observée entre les deux lots aux même dates (J10, J13 et J17). Le nombre de copies du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ chez les porcs de l'animalerie 2 était significativement supérieur à J10 ($P = 0,0057$), mais ne sont plus que marginalement à J13 ($P = 0,075$) et J17 ($P = 0,057$) par rapport aux porcs de l'animalerie 3. L'analyse du nombre de prélèvements détectés positifs pour le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ à partir de la période d'administration du probiotique (J8) a montré une différence significative entre le lot 2 (15/40) et le lot 3 (2/40) ($P < 0,001$).

***Tableau 25*:** Récapitulatif des moyennes et écarts-types du nombre de copies et du nombre d'échantillons positifs pour la détection d'*E. coli*, d'*E. coli* ED1a et du gène $bla_{CTX-M-1}$ à partir des matières fécales lors du 1er essai (en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN) (1er essai)

m : moyenne ; ECT : écart-type ; N+/N : nombre de prélèvements positifs /nombre de prélèvements testés ; NT : non testé

	qPCR *E. coli*						**qPCR *E. coli* ED1a**			**qPCR du gène $bla_{CTX-M-1}$**					
	Témoins (A1)		***E. coli* M63 (A 2)**		***E. coli* M 63+ *E. coli* ED1a (A 3)**		***E. coli* M 63+ *E. coli* ED1a (A 3)**			***E. coli* M63 (A 2)**			***E. coli* M 63+ *E. coli* ED1a (A 3)**		
Date	**m**	***ECT***	**m**	***ECT***	**m**	***ECT***	**m**	**ECT**	**N+/N**	**m**	**ECT**	**N+/N**	**m**	**ECT**	**N+/N**
J-1	4,38	0,38	4,57	0,62	NT	-	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	-
J1	4,30	0,41	4,64	0,45	5,10	0,34	0,00	0,00	0/8	3,42	0,61	8/8	2,33	1,93	5/8
J3	4,02	0,50	3,66	0,65	4,43	0,33	0,00	0,00	0/8	0,91	1,68	2/8	0,57	1,05	2/8
J7	3,62	0,68	2,81	1,10	4,88	0,71	0,00	0,00	0/8	0,66	1,87	1/8	0,35	0,99	1/8
J10	3,70	0,47	3,88	0,41	5,13	0,33	3,34	0,70	8/8	1,49	1,63	4/8	0,00	0,00	0/8
J13	4,15	0,61	4,03	0,68	4,29	0,66	2,78	0,41	8/8	1,86	2,18	4/8	0,00	0,00	0/8
J17	4,69	0,52	4,16	0,61	4,15	0,61	1,73	1,13	6/8	1,61	1,81	4/8	0,00	0,00	0/8
J22	4,32	0,50	5,02	0,23	4,14	0,33	1,62	1,07	6/8	0,93	1,16	3/8	0,30	0,85	1/8
J28	4,48	0,50	4,02	0,51	3,88	0,75	1,37	1,14	5/8	0,00	0,00	0/8	0,27	0,77	1/8

A1 : Animalerie 1 ; A2 : Animalerie 2 ; A3 : Animalerie3

Prélèvements réalisés après le début de l'administration du probiotique

1-3 Résultats d'analyses des prélèvements de lisiers

1-3-1 Dénombrement des entérobactéries CTX^R

Le dénombrement des entérobactéries CTX^R présentes dans le lisier a été réalisé sur les lisiers collectés à J7, soit une semaine après inoculation des porcs avec la souche *E. coli* M63, puis sur ces lisiers stockés en chambre froide (température de 4±3°C) jusqu'à 84 jours après collecte.

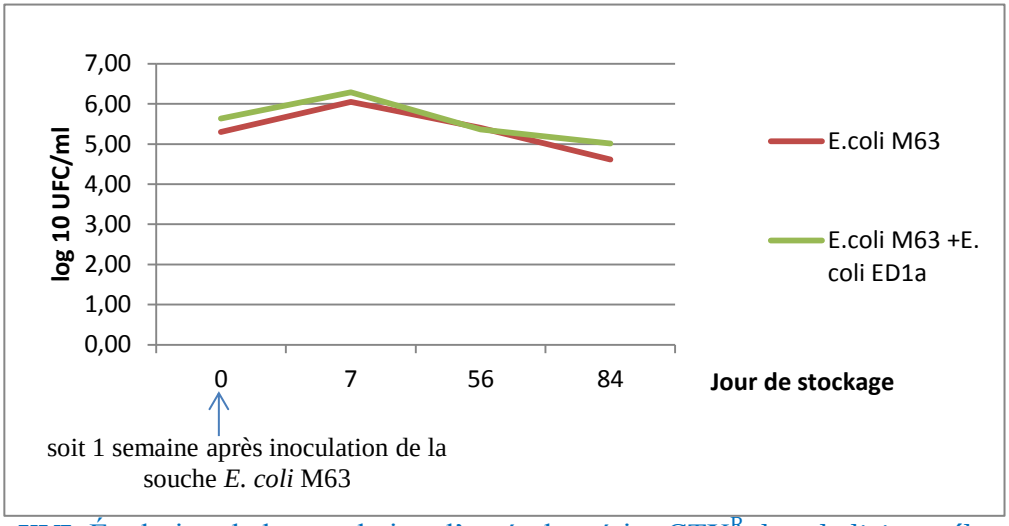


Figure XVI: Évolution de la population d'entérobactéries CTX^R dans le lisier prélevé à J7 et stocké en chambre froide lors du 1er essai

L'analyse bactériologique des lisiers collectés à J7 (figure XVIII), soit une semaine après inoculation avec la souche *E. coli M63*, a montré une population en entérobactéries CTX^R élevée, avec une moyenne de 5,47 log 10 UFC/ml pour les animaleries 2 et 3, lors du prélèvement des échantillons. Aucune entérobactérie CTX^R n'a été détectée dans le lisier provenant de l'animalerie témoin. Malgré une conservation des lisiers en chambre froide, une augmentation des titres d'environ un log10 a été observée pour les deux échantillons après une semaine de stockage. Par la suite, tous les titres d'entérobactéries CTX^R ont diminué légèrement, avec, après 84 jours de stockage, des titres finaux inférieurs en moyenne de 0,6 log au titre initial (Figure XVII).

1-3-2 Analyses moléculaires des lisiers

Des prélevements de lisiers ont été effectués J7, J14, J21 et J28, et ont été stockés en chambre froide jusqu'à 3 mois. Une extraction d'ADN a été réalisée sur chacun de ces prélèvements le jour de la récolte (T0), après stockage pendant une semaine (S+1), un mois (M+1), deux mois après (M+2) et trois mois après (M+3). Une quantification d'*E. coli*, d'*E. coli* ED1a et du gène *bla* $_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a été effectuée par PCR à partir de chaque extrait d'ADN. Le rendement des extractions d'ADN pouvant varier d'un échantillon à l'autre, les résultats des différentes quantifications par PCR ont été ramenés en nombre de copies pour 10 ng d'ADN.

Le rendement moyen de l'ensemble des extractions de lisier était de 15,5 ng/µL, avec un minimum de 9,4 et un maximum de 24,9 ng/µl.

L'ensemble des résultats de la quantification des cibles *E. coli*, *E. coli* ED1a et du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ est présenté dans le tableau 26. Tous les prélèvements de lisiers analysés ont indiqué la présence d'*E. coli*. Le probiotique *E. coli* ED1a n'a pas été détecté pour les lots n'ayant pas reçu cette souche ou avant son inoculation. Les résultats observés ont montré une relative stabilité du nombre d'*E. coli* et du nombre d'*E. coli* ED1a détectés par PCR. En moyenne pour l'ensemble des prélèvements, la perte après trois mois de stockage en chambre froide a été de 0,14 log pour 10 ng d'ADN pour *E. coli* et de 0,15 log pour 10 ng d'ADN pour le probiotique. La détection de la cible *E. coli* ED1a a été la plus importante à J14 soit le lendemain de l'arrêt du traitement avec le probiotique.
La présence du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ n'a pa été détecté dans le lot témoin. Le nombre d'échantillons positifs pour ce gène a décru dans le temps : 8/9, 4/8, 3/8 et 0/10 échantillons pour les lisiers collectés successivement à J7, J14, J21 et J28. Après trois mois de stockage, seulement deux échantillons ont encore été détectés positifs.
Pour évaluer l'impact du probiotique, les nombres d'échantillons positifs pour le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ ont été comparés, 13 prélèvements sur 13 réalisés après l'administration du probiotique ont donné des résultats négatifs en qPCR $bla_{\text{CTX-M-1}}$ pour l'animalerie 3 (M63 puis ED1a), alors que 7 prélèvements sur 13 ont été détectés positifs dans l'animalerie 2 (M63) (P = 0,005).

Tableau 26: Évolution du nombre de copies d'*E. coli*, *E. coli* ED1a et du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ dans les lisiers au moment du prélèvement et après stockage en chambre froide lors du 1er essai (en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN)

Date de récolte		qPCR *E. coli*					qPCR ED1a					qPCR du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$				
	Lot	**T0**	**S+1**	**M+1**	**M+2**	**M+3**	**T0**	**S+1**	**M+1**	**M+2**	**M+3**	**T0**	**S+1**	**M+1**	**M+2**	**M+3**
J7	Témoins (A1)	4,59	4,74	4,61	4,68	4,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	E. coli M63 (A2)	4,32	4,4	3,83	4,22	4,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,71	3,81	NT	3,63	3,49
	E. coli M63 + *E. coli* ED1a (A3)	4,63	4,73	4,55	4,57	4,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,78	4,36	3,82	3,88	0,00
J14	Témoins (A1)	4,09	4,21	NT	4,59	4,65	0,00	0,00	NT	0,00	0,00	0,00	0,00	NT	0,00	0,00
	E. coli M 63 (A2)	4,99	4,62	NT	4,37	4,35	0,00	0,00	NT	0,00	0,00	4,35	4,30	NT	4,10	4,35
	E. coli M63 + *E. coli* ED1a (A3)	4,42	5,19	NT	5,11	5,03	3,72	3,77	NT	3,69	3,56	0,00	0,00	NT	0,00	0,00
J21	Témoins (A1)	4,79	NT	5,01	4,61	4,56	0,00	NT	0,00	0,00	0,00	0,00	NT	0,00	0,00	0,00
	E. coli M63 (A2)	4,34	NT	4,33	4,15	4,44	0,00	NT	0,00	0,00	0,00	4,00	NT	3,89	4,03	0,00
	E. coli M63 + *E. coli* ED1a (A3)	5,26	NT	5,2	5,03	4,58	2,79	NT	2,69	2,35	2,17	0,00	NT	0,00	0,00	0,00
J28	Témoins (A1)	4,73	4,58	4,6	4,4	4,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	E. coli M 63 (A2)	4,49	3,87	3,76	4,35	3,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	E. coli M63 + *E. coli* ED1a (A3)	4,69	4,52	4,37	4,41	4,5	2,02	1,28	1,61	1,79	2,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

T0 : résultat sur lisier frais; S+1 : après une semaine de stockage; S+2 : après deux semaines de stockage ; M+1 : après un mois de stockage ; M+2 : après deux mois de stockage ; M+3 : après trois mois de stockage

A1 : animalerie 1 ; A2 : animalerie 2 ; A3 : animalerie 3

Prélèvements réalisés après le début de l'administration du probiotique

1-4 Conclusion de l'essai 1

Les résultats suite à l'analyse bactériologique ont indiqué une bonne implantation de la souche *E. coli* M63 R-C3G chez les porcs des deux animaleries. Tous les porcs de l'animalerie 2 (M63) ont excrété des entérobactéries CTX^R dès le lendemain de l'inoculation de la souche *E. coli* M63. A cette même date, cinq porcs sur 8 de l'animalerie 3 (M63 puis ED1a) ont excrété des entérobactéries CTX^R.
La quantification de la cible *E. coli* ED1a a montré que tous les porcs de l'animalerie 2 (M63+ED1a) excrétaient cette bactérie à J10 soit 2 jours après le début de l'administration du probiotique *E. coli* ED1a. Cinq porcs sur huit étaient encore excréteurs à la fin de l'essai. Les analyses bactériologiques des matières fécales individuelles ont montré que l'administration d'*E. coli* ED1a huit jours après l'inoculation de la souche résistante a conduit à une diminution significative de la quantité des *E. coli* résistants aux C3G excrétés. L'effet a semblé toutefois être limité dans le temps, essentiellement pendant la période d'administration (J10 et J13). Ces analyses ont également permis de mettre en évidence la présence de porc super-excréteur d'entérobactéries CTX^R.

De même, selon les analyses moléculaires, la quantification du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a été significativement inférieure à J10, J13 et J17 chez les animaux ayant reçu le probiotique. Le nombre total de prélèvements détectés positifs pour le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ était également significativement plus élevé pour les porcs ne recevant pas *E. coli* ED1a comparés à ceux qui ont reçu le probiotique. L'analyse des souches isolées des matières fécales a montré que le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ plasmidique diffusait peut-être par un processus de conjugaison vers d'autres *E. coli* de la flore digestive mais pas vers le probiotique *E. coli* ED1a.

L'analyse des prélèvements de lisier a montré une détection plus importante du probiotique *E. coli* ED1a à J14, soit juste après l'arrêt du traitement par le probiotique. Le nombre d'échantillons de lisiers détectés positifs pour le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ par PCR était significativement inférieur pour les animaux ayant reçu *E. coli* ED1a comparés aux animaux non traités avec la souche *E. coli* ED1a.

Ces résultats nous ont incités à tenter de confirmer l'impact bénéfique de l'administration d'*E. coli* ED1a lors d'un essai supplémentaire (essai 2).

2- 2ème essai

Cet essai visait à confirmer les résultats du premier essai concernant la capacité de la souche *E. coli* ED1a à réduire le portage d'une souche résistante aux C3G. De plus, l'effet de deux doses différentes de la souche *E. coli* ED1a a été comparé.Les porcs des animaleries B1, B2 et B3 ont été inoculés avec $7{,}03 \times 10^7$ UFC d'*E. coli* M63 à J0 .
Pour la souche *E. coli* ED1a, les porcs de l'animalerie B3 ont reçu $7{,}4 \times 10^7$ UFC par porc quotidiennement de J8 à J13. Pour les porcs de l'animalerie B4, le titre de la souche *E. coli* ED1a était de $6{,}5 \times 10^8$ UFC par porc quotidiennement.

2-1 Symptômes et croissance des porcs

Aucun signe de diarrhée n'a été relevé tout au long de l'essai. Quelques hyperthermies modérées (< 41°C) ont été observées dans les animaleries B2, B3 et B4 durant la première semaine suivant l'inoculation de la souche *E. coli* M63. Les moyennes des poids des différents lots sont présentées dans le tableau 27. Les poids moyens des différents lots n'étaient pas significativement différents.

Tableau 27: Poids moyen des porcs (kg) dans les différents lots lors du 2ème essai

Lot (n)	J0	J7	J14	J21	J31
Lot B1 (Témoins) (6)	21,47	27,37	32,65	38,28	47,98
Lot B2 (*E. coli* M63) (8)	21,01	25,91	31,30	37,56	46,69
Lot B3 (*E. coli* M63 puis *E. coli* ED1a « faible dose ») (10)	21,99	27,25	32,98	39,40	49,84
Lot B4 (*E. coli* M63 puis *E. coli* ED1a « forte dose ») (10)	20,81	24,73	30,81	36,74	45,93

(n) : nombre de porc par lot

Les autopsies réalisées sur l'ensemble des porcs des quatre animaleries n'ont montré aucunes lésions au niveau des différents organes (poumon, cœur, reins, rate, foie).

2-2 Résultats d'analyses des matières fécales

2-2-1 Analyses bactériologiques des matières fécales

- Dénombrement des entérobactéries CTX^R

Les cultures réalisées sur les prélèvements de l'animalerie B1 ou des autres animaleries avant inoculation de la souche M63, n'ont pas révélé la présence de souches résistantes aux C3G.
Pour les porcs des animaleries B2, B3 et B4 après inoculation, des entérobactéries résistantes aux CTX ont été détectées chez la plupart des animaux. Ainsi huit jours après l'inoculation de la souche *E. coli* M63, avant l'inoculation de la souche *E. coli* ED1a, 18/21 (85,7 %) des porcs étaient porteurs d'entérobactéries résistantes.
Dans les jours suivants, tous les porcs de B2 et de B3 testés restaient porteurs, alors qu'à J13, J16 et J23, un des porcs de l'animalerie B4 (différent à chaque date) ne semblait plus excréter d'entérobactéries résistantes.
Les titres observés à une même date ont montré de fortes variations entre les animaux. Ainsi, à J31, les porcs 4616 et 4572 de l'animalerie B4 ont excrété respectivement 1,82 et 4,03 log d'UFC/g. Globalement, certains animaux ont excrété nettement plus d'entérobactéries résistantes comparés à d'autres.

Dans le même parc, pour l'ensemble des prélèvements analysés, le porc 4590 a excrété en moyenne 2,65 log UFC/gramme de fèces, alors que le porc 4628 a excrété 4,41 10 log UFC/gramme de fèces.
Les moyennes du nombre d'entérobactéries CTX^R retrouvées dans ces prélèvements ont été calculées par jour et pour chaque lot et sont présentées dans la figure XVII.

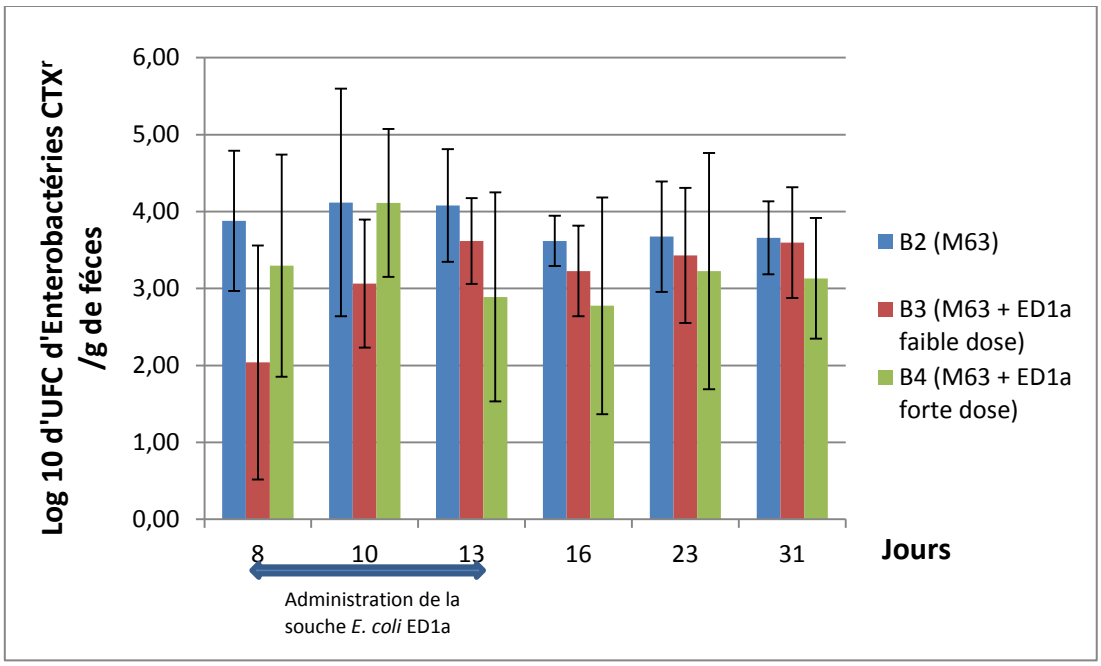


Figure XVII: Évolution de la population d'entérobactéries CTX^R lors du 2ème essai

De J8 à J31, la moyenne de la population d'entérobactéries CTX^R était comprise entre 2,04 et 4,12 log UFC par gramme de fèces. Pour chaque animalerie, des variations importantes du nombre de souches CTX^R ont été notées entre les porcs (effet animal) mais semblaient se réduire au cours du temps. Une différence significative entre les trois lots n'a été constatée qu'à J8 (P = 0,04), alors que le probiotique *E. coli* ED1a n'avait pas encore été administré.

- <u>Caractérisation des entérobactéries CTX^R isolées des matières fécales</u>

Après dénombrement sur MC + CTX, 657 isolats provenant de colonies caractéristiques d'*E. coli* ont été conservés. Tous ces isolats ont été détectés positifs en PCR vis-à-vis du gène blaCTX-M du groupe 1. Quatre cent trente-huit de ces isolats, soit 66,6%, présentaient également une résistance phénotypique à la rifampicine (Rif^R), comme la souche inoculée *E. coli* M63. L'analyse par PCR temps réel spécifique d'*E. coli* basée sur le gène d'ARNr 16S des 657 isolats s'est révélée négative pour seulement deux isolats. Ces deux isolats ont été isolés de deux animaleries différentes et différentes dates. Le premier isolat CTX^R et Rif^R a été récupéré chez un porc de l'animalerie B3 (M63 puis *E. coli* ED1a faible dose) à J8. Le second CTX^R et Rif^S a été isolé chez un porc de l'animalerie B2 (M63) à J10. Ces deux isolats ont finalement été identifiés comme des *E. coli* par MALDI-TOF. Le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a également été détecté dans l'ensemble des isolats.

Les premiers isolats Rif^S ont été isolés dès J8 dans les trois animaleries. Le typage phylogénétique de ces 219 isolats Rif^S ont montré que le gène $bla_{CTX-M-1}$ a été acquis par des souches des groupes C, D, E F et majoritairement B1 (112/219 soit 51,1%). Aucun de ces isolats n'appartient au groupe B2, groupe phylogénétique la souche *E. coli* ED1a inoculée. Les proportions de souches appartenant aux différents groupes phylogénétiques sont indiquées dans le Tableau 28.

Tableau 28: Groupe phylogénétique des isolats CTX^R et Rif^S isolés de matières fécales lors du 2ème essai

Lots / **Groupe phylogénétique**	***E. coli* M63 (n) (lot B2)**	***E. coli* M63 + ED1a faible dose (n) (lot B3)**	***E. coli* M63 + ED1a forte dose (n) (lot B4)**
B1	25/69 (36,2%)	3/66 (4,5%)	84/84 (100%)
C	41/69 (59,4%)	30/66 (45,4%)	0/84 (0%)
D	0/69 (0%)	2/66 (3%)	0/84 (0%)
E	1/69 (1,4%)	26/66 (39,4%)	0/84 (0%)
F	2/69 (2,9%)	4/66 (6,1%)	0/84 (0%)

(n) : nombre d'isolats appartenant au groupe phylogénétique/nombre d'isolats testés

Le profil de restriction de 12/112 isolats CTX^R et Rif^S appartenant au groupe phylogénétique B1 a été déterminé par ECP. La sélection de ces isolats a été réalisée par lot et par date lorsque cela était possible. Egalement dans la mesure du possible, les isolats ont été sélectionnés chez des porcs différents. Cinq isolat du lot B2, un isolat du lot B3 et six isolats pour le lot B4 ont été passés en ECP et ainsi permis de vérifier qu'il ne s'agissait pas de la souche *E. coli* M63 qui aurait perdu son caractère de résistance à la rifampicine. Pour trois porcs de l'animalerie B4, 88,9% des isolats CTX^R étaient sensibles à la rifampicine. Ces trois porcs ont également excrété les plus grandes quantités d'entérobactéries CTX^R de leur animalerie de J10 à J23 (environ 1 log UFC/g de plus que les autres). Le transfert de la résistance aux C3G a été détecté au moins une fois dans chaque parc de chaque animalerie.

2-2-2 Analyses moléculaires des matières fécales

Les extraits d'ADN obtenus à partir des matières fécales individuelles ont été analysés par qPCR pour les cibles *E. coli*, *E. coli* ED1a et $bla_{CTX-M-1}$. Le rendement des extractions d'ADN pouvant varier d'un échantillon à l'autre, les résultats des différentes quantifications par PCR ont été ramenés en nombre de copies pour 10 ng d'ADN. Le rendement moyen de l'ensemble des extractions était de 95,5 ng/µl, avec un minimum de 11,2 et un maximaum de 147,9 ng d'ADN/µl. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 29.
Tout les porcs ont été détectés positifs vis-à-vis d' *E. coli* aux différentes dates, avec un titre moyen de 4,1 ± 0,2 log 10 de copie *d'E. coli* pour 10 ng d'ADN.
La cible *E. coli* ED1a n'a pas été détectée dans le lot B1 et B2, ni dans le lot B3 et B4 avant inoculation.

Tous les porcs des animaleries B3 et B4 ayant reçu le traitement par le probiotique ont excrété la souche *E. coli* dès J10 (premier prélèvement collecté après administration) soit deux jours après le début du traitement.

Les quantités excrétées d'*E. coli* ED1a ont été plus élevées pendant la période d'administration dans les animaleries B3 et B4 ($P<0,05$), elles ont diminué par la suite. Les quantités d'*E. coli* ED1a étaient significativement différentes entre les lots B3 et B4 à J10 ($P = 0,001$) et à J13 ($P = 0,04$), mais pas par la suite.

La comparaison des nombres de porcs trouvés positifs pour la présence de la souche *E. coli* ED1a à partir de l'administration du probiotique a montré que le nombre de positifs dans le lot B3 (49 positifs /54) n'était pas significativement différent du lot B4 (49 positifs /50) ($P > 0,05$).

Le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ n'a pas été détecté dans le lot B1 (témoin), ni dans les autres lots avant inoculation de la souche *E. coli* M63. Ce gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ a été détecté chez 15 porcs sur 24, trois jours après inoculation de la souche *E. coli* M63. Mais une diminution du nombre de porcs positifs en PCR CTX-M du groupe 1 a été observée dès J8. A cette date seulement 5 porcs/24 ont été détecté positifs en PCR CTX-M du groupe 1 (B2 : 4/8, B3 :0/8 et B4 :1/8) et cela avant le début du traitement avec le probiotique. La comparaison des nombres de porcs trouvés positifs pour la présence du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ à partir de l'administration du probiotique a montré que le nombre de prélèvements positifs dans le lot B4 (4 positifs /50) tendait à être significativement différent du lot B2 (12 positifs /56) ($P = 0,066$). Par contre, il n'y avait pas de différence significative des nombres de prélèvements positifs entre les lots B2 (12 positifs/56) et B3 (5/54) ($P > 0,05$). L'analyse statistique des résultats du nombre de copies du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ a montré qu'il n'y a pas de différence entre groupes, sauf pour J10. A cette date, le nombre moyen de copies du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ des animaux de B3 était inférieur à la limite de détection et significativement inférieur à celui des animaux de B2 ($P = 0,01$) et tendait à être inférieur à celui de B4 ($P = 0,08$). Il n'y avait pas de différence à J10 entre les lots B2 et le lot B4.

Tableau 29: Moyennes et écart-types du nombre de copies et du nombre d'échantillons positifs pour la détection d'*E. coli*, d'*E. coli* ED1a et du gène $bla_{CTX-M-1}$ pour les prélèvements de matières fécales du 2ème essai (en log 10 du nombre de copies)

Date	qPCR *E. coli*								qPCR *E. coli* ED1a						qPCR $bla_{CTX-M-1}$								
	Témoin (B1)		M63 (B2)		M63+ ED1a 10^8 (B3)		M63+ ED1a 10^{10} (B4)		M63+ ED1a 10^8 (B3)			M63+ ED1a 10^{10} (B4)			M63 (B2)			M63+ ED1a 10^8 (B3)			M63+ ED1a 10^{10} (B4)		
	m	ECT	m	ECT	m	ECT	m	ECT	m	ECT	N+	m	ECT	N+	m	ECT	N+	m	ECT	N+	m	ECT	N+
J0	4,15	0,31	4,05	0,56	3,85	0,77	4,28	0,34	0,00	0,00	0/8	0,00	0,00	0/8	0,00	0,00	0/8	0,00	0,00	0/8	0,00	0,00	0/8
J3	3,62	0,62	4,16	0,55	3,98	0,43	3,97	0,26	0,00	0,00	0/8	0,00	0,00	0/8	2,23	1,83	6/8	2,03	1,40	5/8	1,44	1,83	4/8
J8	4,22	0,54	3,91	0,33	3,98	0,48	4,23	0,70	0,00	0,00	0/8	0,00	0,00	0/8	1,30	1,57	4/8	0,00	0,00	0/8	0,35	1,57	1/8
J10	4,18	0,65	4,17	0,55	4,04	0,26	5,07	0,60	3,33	0,44	8/8	4,71	0,77	8/8	1,98	1,68	5/8	0,00	0,00	0/8	1,29	1,68	3/8
J13	4,04	0,28	4,25	0,72	4,13	0,74	4,85	0,50	3,36	1,15	8/8	4,51	0,76	8/8	1,11	1,55	3/8	0,00	0,00	0/8	0,39	1,55	1/8
J16	3,93	0,53	4,25	0,46	3,85	0,31	3,99	0,63	1,92	0,40	7/7	2,03	0,41	7/7	0,00	0,00	0/8	0,00	0,00	0/7	0,00	0,00	0/7
J20	3,67	0,39	4,35	0,45	3,94	0,54	3,98	0,56	1,80	0,79	8/8	2,05	0,39	7/7	0,38	1,09	1/8	0,73	1,35	2/8	0,00	1,09	0/7
J23	4,41	0,97	4,59	0,53	4,11	0,73	4,84	0,49	1,72	0,85	7/8	2,37	0,51	6/6	0,00	0,00	0/8	0,35	1,00	1/8	0,00	0,00	0/6
J27	4,33	0,77	4,14	0,71	4,27	0,33	4,10	0,77	1,84	0,51	6/7	1,68	0,88	6/7	0,71	1,31	2/8	0,40	1,12	1/7	0,00	1,31	0/7
J31	4,53	0,78	3,78	0,65	4,24	0,74	4,09	0,73	1,24	1,09	5/8	2,07	0 ,35	7/7	0,43	1,23	1/8	0,33	0,92	1/8	0,00	1,23	0/7

Les valeurs situées en dessous de la ligne bleue correspondent aux quantités obtenues sur les prélèvements après le début de l'administration du probiotique *E. coli* ED1a.

N+ : nombre de prélèvements positifs /nombre de prélèvements testés ; NT : non testé

2-3 Résultats d'analyses des prélèvements de lisier

2-3-1 Analyses bactériologiques des lisiers

➢ Dénombrement des entérobactéries CTX^R

Les lisiers collectés à J0, puis une fois par semaine ont été conservés à une température moyenne de 20,7°C ± 2,3°C (minimum : 17,4°C, maximum : 25,2°C) pendant une durée de 2 mois.

Aucune entérobactérie résistante aux C3G n'a été isolée des lisiers des porcs témoins ou avant inoculation de *E. coli* M63. Les résultats des dénombrements pour les autres lots sont présentés dans le tableau 30. Des entérobactéries CTX^R ont été détectées à T0 et S+1 dans tous les prélèvements de lisier effectués à partir de huit jours après l'inoculation de la souche *E. coli* M63, une nette décroissance de ces entérobactéries R-C3G a été observée et après deux mois, tous les échantillons étaient négatifs en culture sur milieux supplémentés. L'analyse des prélèvements de J8 et J27 à T0 n'a pas montré de différence significative entre les lots sur la quantité d'entérobactéries CTX^R ($P > 0,05$). Pour le lisier collecté à J13, les dénombrements effectués à T0 ont montré une quantité d'entérobactéries CTX^R nettement inférieure pour le lot B3 par rapport B2.

Tableau 30: Dénombrement des entérobactéries résistants aux C3G dans les lisiers collectés à J0, J8, J13 ou J27 et analysés à T0, après une semaine (S+1) ou deux mois (M+2) (log10 UFC/ml) (2ème essai)

lot	***E. coli* M63 (B2)**			***E. coli* M63 +ED1a faible dose (B3)**			***E. coli* M63 ED1a forte dose (B4)**		
Date/délai	T0	S+1	M+2	T0	S+1	M+2	T0	S+1	M+2
J0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
J8	4,48	4,63	0,00	3,50	3,14	0,00	3,72	3,40	0,00
J13	4,28	3,68	0,00	1,37	1,21	0,00	3,58	2,45	0,00
J27	3,81	2,65	0,00	3,20	1,53	0,00	3,27	2,52	0,00

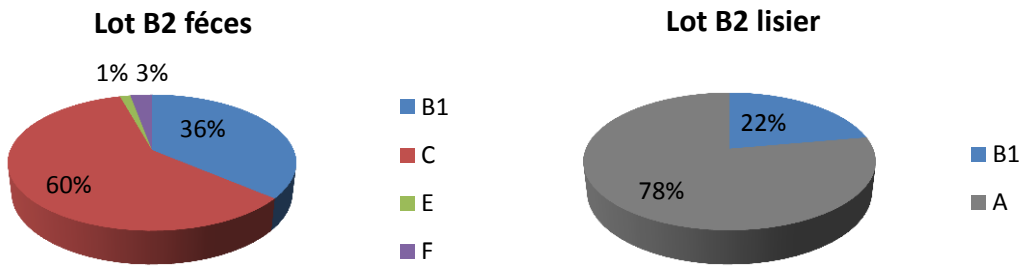
➢ Caractérisation des entérobactéries CTX^R isolées à partir des lisiers

L'analyse bactériologique des lisiers a permis d'obtenir 152 isolats CTX^R appartenant à l'espèce *E. coli* et majoritairement résistants à la rifampicine (115 résistants à la rifampicine/152 isolats, (75,7%)) comme *E. coli* M63. Les résultats du typage phylogénétique des 37 isolats sensibles à la rifampicine présents dans les lisiers sont présentés dans le tableau 31.

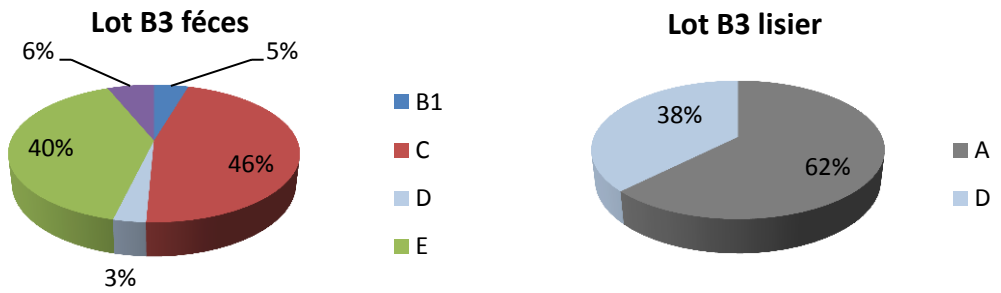
Tableau 31: Groupe phylogénétique des isolats CTX^R et Rif^S isolés à partir des lisiers lors du 2ème essai

Lots Groupe phylogénétique	*E. coli* M63 (B2)	*E. coli* M63 + ED1a faible dose (B3)	*E. coli* M63 + ED1a forte dose (B4)
B1	2	0	20
A	7	5	0
D	0	3	0
total	9	8	20

Pour le lot B4 (ED1a forte dose), tous les isolats étaient du groupe B1, comme observé dans les matières fécales de ce lot. Inversement dans les lots B2 (M63) et B3 (ED1a faible dose), des différences ont été observées entre les isolats obtenus à partir des matières fécales et les isolats obtenus à partir des échantillons de lisier. La figure XVIII représente la répartition des différents groupes phylogénétiques des lots B2 (M63) et B3 (ED1a faible dose) en fonction de leurs origines.



A



B

Figure XVIII **: Répartition des groupes phylogénétiques en fonction de l'origine des isolats**

A : Isolats obtenus à partir des échantillons de lisier ou des féces de porcs dans le lot B2 (M63) B : Isolats obtenus à partir des échantillons de lisier ou des féces de porcs dans le lot B3 (ED1a faible dose)

Dans le lot B2, seulement le groupe phylogénétique B1 a été retrouvé à la fois dans le lisier et les féces. Par contre, les groupes phylogénétiques C, E et F n'ont pas été détectés dans les lisiers, alors qu'ils étaient présents dans les matières fécales et le groupe A était présent dans les lisiers alors qu'aucun isolat des matières fécales n'appartenait à ce groupe. L'analyse statistique a montré qu'il y avait une différence très significative entre les groupes phylogénétiques retrouvés dans les féces et ceux retrouvés dans le lisier (P= 3 x 10^{-9}). Dans le lot B3, le groupe phylogénétique B1 n'a été détecté que dans les féces et en faible quantité comparé au lot B2. Comme dans le lot B2 (M63), seulement 2 groupes phylogénétiques ont été retrouvés dans les isolats obtenus à partir des lisiers. Le seul groupe phylogénétique retrouvé à la fois dans le lisier et les féces est le groupe D. L'analyse statistique a également montré qu'il y avait une différence très significative entre les groupes phylogénétiques retrouvés dans les féces et ceux retrouvés dans le lisier dans le lot B3 (P= 3 x 10^{-9}). Une moindre capacité à la survie dans les lisiers de certains groupes phylogénétiques ou le relativement faible nombre d'isolats analysés peuvent peut-être expliquer ces différences.

2-3-2 Analyses moléculaires des lisiers

Les résultats concernant l'évolution des nombres de copies d'*E. coli* et d'*E. coli* ED1a sont présentés dans le tableau 32. Le rendement des extractions d'ADN variant d'un prélèvement à l'autre, les résultats ont été ramenés en log 10 pour 10 ng d'ADN. Le rendement moyen de l'ensemble des extractions des prélèvements de lisier était de 10,6 ng d'ADN/µl, avec un minimum de 1,9 et un maximum de 66,9 ng d'ADN/µl.Tout les lisiers ont été détectés positifs vis-à-vis de *E. coli*, à toutes les dates et tout le long du stockage. Une diminition moyenne de 1,2 log du nombre de copies d'*E. coli* a été observée entre T0 et M+2.

La cible *E. coli* ED1a n'a pas été détectée dans les lots B1 et B2, ni dans les lots B3 et B4 avant inoculation. Les nombres de copies d'*E. coli* ED1a détectées dans les lisiers étaient plus élevés pendant la période d'administration, et diminaient par la suite. La quantité détectée de la cible *E. coli* ED1a était également plus importante dans le lot B4 par rapport au lot B3 à J13 (0,7 log d'écart). Cette différence diminuait à J20 (0,2 log d'écart) et jusqu'à devenir quasiment nulle à J27.

La diminution au cours du stockage du nombre de copies d'*E. coli* ED1a était plus importante à J20 (perte de 2,42 log) et J27 (perte de 2,51 log), comparée à J13 (perte de 0,99 log).

L'analyse par qPCR pour le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ a montré que ce gène n'est détecté que dans un très faible nombre d'échantillons : 3 positifs/18 pour le lot B2, 0 positif/18 pour le lot B3 et 2 positifs/18 pour le lot B4. Il n'y a pas de différence significative des nombres d'échantillons positifs entre les lots.

Tableau 32: Évolution des nombres de copies d'*E. coli* et d'*E. coli* ED1a dans les lisiers récoltés à différentes dates et stockés à température ambiante lors du 2ème essai (en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN)

		qPCR *E. coli*					qPCR *E. coli* ED1a				
Date de prelèvement	**Animalerie**	**T0**	**S+1**	**S+2**	**M+1**	**M+2**	**T0**	**S+1**	**S+2**	**M+1**	**M+2**
J0	B1	5,71	5,60	5,55	5,13	3,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	B2	4,99	4,63	4,46	3,73	2,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	B3	4,69	3,99	3,85	3,47	3,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	B4	4,93	4,04	3,54	3,69	3,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
J8	B1	4,81	4,75	4,73	NT	4,20	0,00	0,00	0,00	NT	0,00
	B2	5,20	5,27	5,15	NT	4,86	0,00	0,00	0,00	NT	0,00
	B3	4,39	4,56	4,35	NT	3,82	0,00	0,00	0,00	NT	0,00
	B4	4,76	4,83	4,75	NT	3,98	0,00	0,00	0,00	NT	0,00
J13	B1	4,61	4,78	4,70	4,42	3,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	B2	5,13	5,17	5,22	5,17	4,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	B3	4,89	4,77	4,74	4,50	3,74	4,62	4,40	4,43	4,20	3,60
	B4	5,45	5,36	5,36	5,10	4,56	5,32	5,08	5,14	4,87	4,36
J20	B1	4,60	4,56	NT	3,94	3,54	0,00	0,00	NT	0,00	0,00
	B2	4,92	5,12	NT	4,60	1,97	0,00	0,00	NT	0,00	0,00
	B3	4,57	4,41	NT	3,91	3,22	3,7	3,23	NT	2,9	1,07
	B4	5,13	4,82	NT	3,94	4,09	3,82	3,66	NT	2,9	1,64
J27	B1	4,34	4,22	4,04	3,54	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	B2	5,19	4,77	4,82	3,61	3,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	B3	4,58	4,44	4,75	3,84	3,69	2,94	2,25	1,86	0,43	0,85
	B4	5,05	4,89	5,07	4,64	4,00	2,88	2,00	2,03	0,81	0,00

T0 : résultat sur lisier frais ; S+1 : après une semaine de stockage ; S+2 : après deux semaines de stockage ; M+1 : après un mois de stockage ; M+2 : après deux mois de stockage ; NT : non test

2-4 Conclusion de l'essai 2

Lors du premier essai, les doses inoculées de la souche *E. coli* M63 et de la souche *E. coli* ED1a était quasiment identiques (environ 10^8 UFC/porc à chaque jour d'administration pour les deux souches). Pour cet essai, cette proportion a été gardée pour l'animalerie B3 (ED1a faible dose) (environ 10^7 UFC/porc). Par contre, une différence d'environ 1 log a été souhaitée entre la souche *E. coli* M63 et la souche *E. coli* ED1a pour l'animalerie B4 (ED1a forte dose), afin de favoriser la souche ED1a.

L'analyse bactériologique a permis de confirmer la bonne implantation de la souche *E. coli* M63. Sur l'ensemble des trois animaleries, 18 porcs sur 21 étaient porteurs d'entérobactéries CTX^R huit jours après l'inoculation de la souche *E. coli* M63. Comme dans le précédent essai, le dénombrement des entérobactéries CTX^R a permis de mettre en lumière des différences individuelles sur la quantité excrétée.

La quantification de la souche *E. coli* ED1a a montré que tous les porcs traités avec cette souche étaient porteurs de cette cible à J10. A la fin de l'essai, soit 18 jours après la dernière administration, 12 sur 15 étaient encore porteurs de la souche *E. coli* ED1a.

Les analyses bactériologiques des matières fécales n'ont pas permis de confirmer la capacité de la souche *E. coli* ED1a à réduire l'excrétion de souches résistantes aux C3G. Les analyses moléculaires sur les matières fécales ont montré un effet significatif à J10 uniquement, soit lors de l'inoculation, pour le nombre de copies du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ dans les échantillons de matières fécales du lot recevant *E. coli* ED1a à faible dose comparé au lot ne recevant pas *E. coli* ED1a (P=0,01). A cette date, les lots B3 et B4 tendaient à être différents (P = 0,08). Il existait également une différence significative pour le nombre total d'échantillons détectés positifs pour le gène de résistance, avec plus de prélèvements détectés positifs dans le lot B2 (12 positifs /56) comparé au lot B4 (4 positifs /50) (P = 0,066).

Comme lors de l'essai précédent, le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a été transmis *in vivo* à différents *E. coli* du microbiote intestinal mais apparemment pas à *E. coli* ED1a.

L'analyse bactériologique des prélèvements de lisiers a montré l'absence de détection des entérobactéries CTX^R après deux mois de stockage à température ambiante. Les nombres de copies d'*E. coli* ED1a détectées dans les lisiers étaient plus élevés pendant la période d'administration, résultat cohérent avec les résultats obtenus sur les matières fécales. Ces résultats nous ont incité à tester l'impact d'un autre probiotique (*E. coli* Nissle) en présence dans le microbiote porcin d'une souche *E. coli* CTX^R d'origine porcine (*E. coli* M63) ou d'une souche d'origine humaine (*E. coli* TN03) (essai 3).

3- 3ème essai

Ce troisième essai visait à comparer l'efficacité de deux « probiotiques » (*E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle) vis-à-vis de l'excrétion d'entérobactéries R-C3G, chez des porcs inoculés avec soit *E. coli* M63, soit *E. coli* TN03, une souche pathogène d'origine humaine, porteuse de $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$.

L'essai devait aussi permettre de déterminer si la souche *E. coli* TN03, d'origine humaine, est capable de transférer son plasmide de résistance à d'autres bactéries de la flore intestinale porcine. Les contraintes matérielles (nombre d'animaleries et d'animaux disponibles) n'ont malheureusement pas permis d'inclure des lots témoins inoculés avec la souche *E. coli* M63 ou la souche *E. coli* TN03 seulement.
Les porcs des animaleries B1 et B2 ont reçu 7,8 x 10^9 UFC d'*E. coli* M63 par voie orale. Parallèlement, les porcs des animaleries B3 et B4 ont reçu 6,8 x 10^9 UFC d'*E. coli* TN03. Pour les probiotiques administrés de J8 à J12, les titres sont présentés dans le tableau 33.

Tableau 33: Titres des probiotiques administrés aux porcs au cours du 3ème essai (UFC/porc)

Souche *E. coli*	**J8**	**J9**	**J10**	**J11-J12**
Nissle	6,6 x 10^9	10,8 x 10^9	21,1x 10^9	23,3 x 10^9
ED1a	2,85 x 10^9	16,3x 10^9	10,9 x 10^9	13,1 x 10^9

3-1 Symptômes et croissance des porcs

Dans l'animalerie B4 (*E. coli* TN03 puis *E. coli* Nissle), des « coups de flanc » ont été observés l'après-midi de l'inoculation de la souche *E. coli* TN03, avec hyperthermie le lendemain de 40,4°C à 40,6°C pour trois des cinq animaux. A J8, soit 9 semaines après la naissance, dans l'animalerie F3 (*E. coli* Nissle), avant inoculation de la souche *E. coli* Nissle, des animaux présentaient de la diarrhée, sans hyperthermie ; au total deux animaux ont eu de la diarrhée dans l'animalerie F3; une recherche au laboratoire vétérinaire de diagnostic (Labocéa, Ploufragan) montre la présence de Rotavirus. Le tableau 34 présente les gains de poids des différents lots.

Tableau 34: Gains de poids (en kg) des différents lots lors du 3ème essai

Animalerie	Lot (n)	J0-J7	J7-J14	J14-J20	J7-J20	J0-J20
F1	Témoins (5)	7,34	3,86	6,62	10,48	17,82
F2	*E. coli* ED1a (5)	3,7	6,94	7,74	14,68	18,38
F3	*E. coli* Nissle (5)	5,84	4,5	7,04	11,54	17,38
B1	*E. coli* M63 + *E. coli* ED1a (5)	5,7	6,72	5,52	12,24	17,94
B2	*E. coli* M63 +*E. coli* Nissle (5)	6,26	7,04	5,8	12,84	19,1
B 3	*E. coli* TN03 + *E. coli* ED1a (5)	5,76	6,26	6,36	12,62	18,38
B4	*E. coli* TN03+ *E. coli* Nissle (5)	5,12	6,46	6,24	12,7	17,82

(n) : nombre de porc par animalerie

L'analyse statistique a montré qu'il n'y avait pas de différence significative des gains de poids entre les lots suite à l'inoculation de souches R-C3G, *E. coli* M63 ou *E. coli* TN03.
Pour la période J7-J20 suivant l'administration des probiotiques, on a pu regrouper les animaux selon le probiotique reçu. Une différence significative (P = 0,017) a été observée entre les lots. Une croissance plus importante a été observée dans les lots ayant reçu *E. coli* ED1a comparé au lot témoin. Mais il faut noter un faible effectif dans les différents lots.

Les autopsies réalisées sur l'ensemble des porcs des sept animaleries n'ont montré aucunes lésions au niveau des différents organes (poumon, cœur, reins, rate, foie).

3-2 Résultats d'analyses des matières fécales

3-2-1 Analyses bactériologiques des matières fécales

- Dénombrement des entérobactéries CTX^R

Le dénombrement des entérobactéries CTX^R a été réalisé sur les prélèvements de matières fécales de porcs présents dans les différentes animaleries.
Les cultures réalisées sur les prélèvements de l'animalerie F1, F2 et F3 (animaux non inoculés avec les souches R-C3G) n'ont pas révélé la présence d'entérobactéries CTX^R.

Les moyennes du nombre d'entérobactéries CTX^R retrouvées dans les prélèvements des lots inoculés B1, B2, B3 et B4 ont été calculées par jour. La figure XIX présente ces résultats ramenés en log 10 d'entérobactéries CTX^R par gramme de fèces.

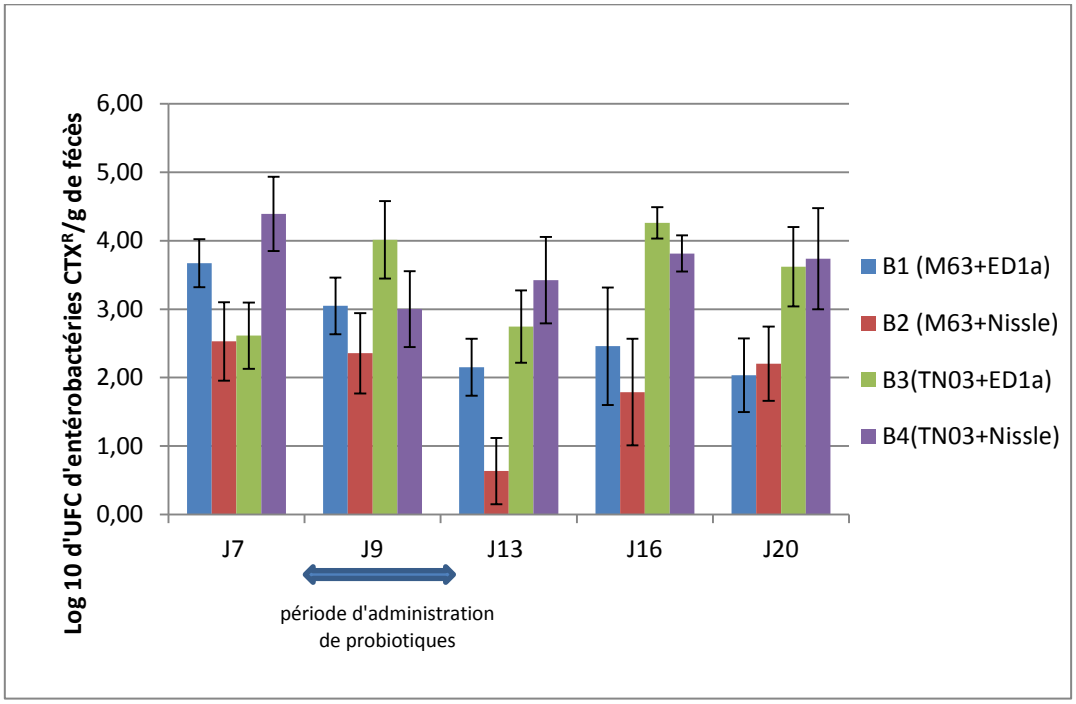


Figure XIX: Évolution de la population d'entérobactéries CTX^R présente dans les matières fécales des porcs inoculés avec une souche résistante et en présence d'un probiotique lors du 3ème essai

A J7, 100% des prélèvements de porcs des 4 animaleries inoculés avec une souche *E. coli* R-C3G ont été trouvés positifs pour la présence d'entérobactéries résistantes au CTX.
A cette même date, des différences ont été observées sur la quantité d'entérobactéries CTX^R excrétées entre les lots. En effet, les porcs des animaleries B1 et B4 tendent à excréter une quantité plus importante d'entérobactéries CTX^R que les porcs des animaleries B2 et B3 (P = 0,057).Le nombre d'entérobactéries excrétées par les animaux des animaleries B1 et B2 tendait à être marginalement inférieur à J13 comparé à J7 (B1 : P = 0,062 ; B2 : P = 0,062). Par contre, pour cette même période, il n'y avait pas de différence significative pour les animaleries B3 et B4. Sur l'ensemble de la période (J7 à J20), le nombre d'entérobactéries CTX^R n'était pas significativement différent entre les lots ayant reçu le probiotique *E. coli* ED1a ou *E. coli* Nissle.
Comme dans les deux précédents essais, une variation d'entérobactéries CTX^R entre les animaux à une même date a été observée. A J13, les porcs 4201 et 4142 de l'animalerie B4 ont excrété respectivement 1,30 et 4,58 log d'UFC/g de fèces.

➢ Caractérisation des entérobactéries CTX^R isolées des matières fécales

Suite au dénombrement sur MC+CTX, 430 isolats appartenant à l'espèce *E. coli* ont été collectés. 192 *E. coli* ont été isolés à partir des matières fécales des porcs des lots B1 et B2 et 238 *E. coli* des lots B3 et B4. L'appartenance des isolats des lots B1 et B2 à la souche *E. coli* M63 a été vérifiée grâce au caractère de résistance à la rifampicine.
Pour les souches d'*E. coli* isolées des lots B3 et B4, l'appartenance de ces isolats à la souche *E. coli* TN03 a été déterminée par PCR (Clermont *et al.* 2008a).
Le tableau 35 présente le pourcentage d'*E. coli* appartenant à la souche *E. coli* M63 ou à la souche *E. coli* TN03, parmi les *E. coli* R-C3G.

Tableau 35: Pourcentage et le nombre d'*E. coli* appartenant aux souches *E. coli* CTX^R inoculés (*E. coli* M63 ou *E. coli* TN03) obtenus lors du 3ème essai

	J7 (n)	J9 (n)	J13 (n)	J16 (n)	J20 (n)
M63+ED1a (B1)	80 % (20/25)	68 % (17/25)	77,2 % (17/22)	29,4 % (5/17)	35,3 % (6/17)
M63+Nissle (B2)	100 % (25/25)	100 % (20/20)	83,3 % (5/6)	93,7 % (15/16)	100 % (19/19)
TN03+ED1a (B3)	100 % (24/24)	100 % (20/20)	100 % (24/24)	100 % (25/25)	100 % (25/25)
TN03+nissle (B4)	100 % (25/25)	100 % (25/25)	100 % (22/22)	100 % (25/25)	100 % (23/23)

(n) : nombre d'*E. coli* appartenant aux souches *E .coli* CTX^R inoculés/nombre de souches testées

L'analyse de 238 isolats d'*E. coli* CTX^R obtenus à partir des lots inoculés avec la souche *E. coli* TN03 n'a pas permis de détecter la diffusion du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ de la souche *E. coli* TN03 vers d'autres entérobactéries présentes chez les animaux, alors que 46 sur 192 des isolats CTX^R collectés à partir des porcs inoculés avec *E. coli* M63 semblent correspondre à des souches autres que la souche *E. coli* M63 ayant acquis le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$.
Ces résultats ont également été analysés selon le probiotique reçu. Une diffusion du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a été observée dès J7 pour le lot B1 (M63 puis ED1a), alors que cette diffusion n'a été observée qu'à partir de J13 pour l'animalerie B2 (M63 puis Nissle). A J16, les distributions d'*E. coli* CTX^R et Rif^R (comme M63) ou CTX^R et Rif^S (non M63) obtenues dans les animaleries B2 (93,7 % de Rif^R) et B1 (29,7% de Rif^R) étaient significativement différentes ($P = 0,05$). Sur l'ensemble de l'essai (de J7 à J20), le nombre d'isolats sensibles à la rifampicine était significativement inférieur pour le lot B2 (2/86) par rapport au lot B1 (41/106) ($P < 0,001$). Les groupes phylogénétiques des isolats CTX^R et Rif^S des lots B1 et B2 obtenus sur l'ensemble de l'essai n'appartenant pas aux *E. coli* R-C3G inoculés (41 provenant de l'animalerie B1 et 2 de l'animalerie B2) ont été déterminés par PCR (Clermont *et al.* 2013).

Les deux isolats de l'animalerie B2 (M63 + Nissle) appartiennent au groupe phylogénétique B1. Les proportions de souches isolées du lot B1 (M63 + ED1a) appartenant aux différents groupes phylogénétiques sont indiquées dans le tableau 36. Le groupe phylogénétique B1 a été majoritairement détecté ; parmi les 41 isolats, 24 appartiennent à ce groupe phylogénétique (58,5%).

Tableau 36: Répartition des différents groupes phylogénétique du lot B1 en fonction des jours de prélèvements (3ème essai)

Groupe phylogénétique	J7 n+/n	J9 n+/n	J13 n+/n	J16 n+/n	J20 n+/n
B1	5/5 (100%)	8/8 (100%)	1/5 (20%)	5/12 (41,7%)	5/11 (45,6%)
C	0/5 (0%)	0/8 (0%)	2/5 (40%)	0/12 (0%)	1/11 (9,10%)
F	0/5 (0%)	0/8 (0%)	2/5 (40%)	6/12 (50%)	1/11 (9,10%)
A	0/5 (0%)	0/8 (0%)	0/6 (0%)	1/12 (8,3%)	4/11 (36,3)

n+/n : nombre d'isolats appartenant au groupe phylogénétique/nombre d'isolats CTX^R et Rif^S par date testés

Plusieurs isolats obtenus à différentes dates chez un même porc appartiennent à plusieurs groupes phylogénétiques. A titre d'exemple, le porc 4138 du lot B1 a excrété une souche CTX^R Rif^S d'*E. coli* de groupe phylogénétique B1 à J7 et une souche de groupe phylogénétique A à J20. Parmi les 26 souches issues des animaleries B1 et B2, appartenant au groupe phylogénétique B1, seulement 7 isolats ont été analysées par ECP afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas de la souche *E. coli* M63 ayant perdu son caractère de résistance à la rifampicine. Ces sept isolats ont été choisis en sélectionnant un isolat à chaque date et de porcs différents. Pour ces sept isolats, cinq isolats étaient issus du lot B1 (M63 puis ED1a) et deux étaient issus du lot B2 (M63 puis Nissle). Aucun des sept isolats n'a montré le même profil de restriction que la souche *E. coli* M63 inoculés. Le profil de restriction était similaire pour les cinq isolats obtenus chez différents animaux du lot B1. Par contre, les deux souches appartenant au groupe phylogénétique B1 isolées de porcs différents dans l'animalerie B2 (M63 puis Nissle) n'ont pas le même profil génétique.

3-2-2- Analyses moléculaires des matières fécales

Les résultats concernant l'évolution des nombres de copies d'*E. coli*, d'*E. coli* ED1a, d'*E. coli* Nissle et du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ sont présentés dans le tableau 37. Le rendement des extractions d'ADN variaient d'un prélèvement à l'autre, pour cela les résultats ont été ramenés en log 10 pour 10 ng d'ADN.

Le rendement moyen sur la totalité des extractions réalisé à partir des matières fécales était de 119,1 ng d'ADN/µl, avec un minimum de 4,5 et un maximum de 309,2 ng d'ADN/µl.

Tous les prélèvements ont été détectés positifs pour la cible *E. coli*. Les valeurs obtenues pour *E. coli* étaient globalement stables, aux environs de 3,9 log copies pour 10 ng d'ADN.

Les tests moléculaires montrent que les probiotiques *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle n'ont pas été détectés chez les animaux avant inoculation. A J9, soit 2 jours après le début de l'administration des probiotiques, dix porcs sur 15 (lot F2, B1 et B3) excrétaient le probiotique *E. coli* ED1a. A cette même date, 100 % des porcs des lots F3, B2 et B4 excrétaient le probiotique *E. coli* Nissle. Pendant les jours d'administration, les titres étaient de l'ordre de 2,5 log de copies pour 10 ng d'ADN pour la souche *E. coli* ED1a et de 3 log de copies pour 10ng d'ADN pour la souche *E. coli* Nissle, mais ont diminué ensuite rapidement. Le titre d'*E. coli* ED1a pour les animaleries F2, B1 et B3 sont significativement supérieurs pendant à la période d'administration du probiotique (J9 à J13) par rapport à la période post-administration (J16 à J20) (P = 0,03). Cette observation est également valable pour les animaux ayant reçu le probiotique *E. coli* Nissle (P = 0,03). Malgré cette diminution, 12 porcs sur 15 (lot F2, B1 et B3) restaient porteurs du probiotique *E. coli* ED1a à J20 et 100 % des porcs des lots F3, B2 et B4 restaient porteurs du probiotique *E. coli* Nissle à cette même date.
Le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ n'a pas été détecté chez les animaux du lot témoin, ni dans les autres lots avant inoculation des souches d'*E. coli* contenant le gène $bla_{\text{CTX-M}}$ du groupe 1. Les quantités de copies du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ étaient aux environs de 1 log copies pour 10 ng d'ADN deux jours après inoculation de *E. coli* M63 ou *E. coli* TN03 mais le gène n'a été que très rarement détecté par qPCR à partir de J7, donc avant administration des probiotiques.

Tableau 37: Moyennes du nombre de copies des cibles *E. coli*, *E. coli* ED1a, *E. coli* Nissle et du gène blaCTX-M-1 et nombres de prélèvements positifs de matières fécales pour les probiotiques et le gène blaCTX-M-1 (en log 10 du nombre de copies pour 10 ng d'ADN) (3ème essai)

Lot	*qPCR E. coli*							qPCR *E. coli* ED1a			qPCR *E. coli* Nissle			qPCR $bla_{CTX-M-1}$			
	Témoin (F1)	*E. coli* ED1a (F2)	*E. coli* Nissle (F3)	*E. coli* M63 +*E. coli* ED1a (B1)	*E. coli* M63 +*E. coli* Nissle (B2)	*E. coli* TN03+ *E. coli* ED1a (B3)	*E. coli* TN03+ *E. coli* Nissle (B4)	*E. coli* ED1a (F2)	*E. coli* M63+ *E. coli* ED1a (B1)	*E. coli* TN03+ *E. coli* ED1a (B3)	*E. coli* Nissle (F3)	*E. coli* M63+ *E. coli* Nissle (B2)	*E. coli* TN03+ *E. coli* Nissle (B4)	*E. coli* M63+ *E. coli* ED1a(B1)	*E. coli* M63+ *E. coli* Nissle (B2)	*E. coli* TN03+ *E. coli* ED1a (B3)	*E. coli* TN03+ *E. coli* Nissle (B4)
J0	3,04	NT	NT	3,66	3,91	3,94	4,35	NT	0,00	0,00	NT	0,00	0,00	0,00 (0/5[a])	0,00 (0/4[a])	0,00 (0/5[a])	2,28 (5/5[a])
J2	3,23	NT	NT	3,97	4,46	3,21	4,40	NT	0,00	0,00	NT	0,00	0,00	0,36 (4/5 [a])	0,48 (4/4 [a])	1,13 (4/4 [a])	2,28 (5/5 [a])
J3	3,23	NT	NT	3,75	4,10	3,71	4,45	NT	0,00	0,00	NT	0,00	0,00	1,70 (5/5 [a])	1,20 (5/5 [a])	0,83 (3/5 [a])	2,51 (3/4 [a])
J7	3,30	3,07	3,06	4,16	5,15	3,53	3,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/5 [a])
J9	3,68	4,16	4,48	4,37	4,02	4,41	3,94	1,38 (2/5[a])	2,17 (4/5[a])	3,98 (4/5[a])	3,42 (5/5[a])	2,17 (5/5[a])	3,09 (5/5[a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/4 [a])	0,00 (0/5 [a])
J13	3,77	4,30	4,03	3,65	4,36	4,30	4,63	3,49 (5/5[a])	2,89 (5/5[a])	3,75 (5/5[a])	3,49 (5/5[a])	3,15 (4/4)	4,18 (4/4[a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/4 [a])
J16	3,34	3,37	3,27	3,53	5,60	3,53	4,36	0,24 (1/5[a])	0,65 (2/5[a])	0,90 (3/5[a])	2,10 (5/5[a])	1,70 (4/4)	2,38 (5/5[a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/4 [a])	0,65 (1/5 [a])	0,00 (0/5 [a])
J20	2,56	3,83	3,45	4,10	4,62	3,82	4,23	1,27 (3/5[a])	0,97 (4/5[a])	1,66 (5/5[a])	1,22 (5/5[a])	1,22 (5/5[a])	1,68 (4/4[a])	0,00 (0/5 [a])	0,00 (0/5 [a])	0,14 (1/5 [a])	0,00 (0/4 [a])

([a]) : nombre de prélèvement positif/nombre de prélèvement testé ; NT : non testé

3-3 Conclusion de l'essai 3

L'inoculation de la souche *E. coli* TN03 semble avoir entrainé des signes cliniques sans gravité chez les porcs inoculés. L'administration des probiotiques n'a pas été suivie de symptômes et semble favoriser la croissance mais ces résultats sont à prendre avec précaution vu le très faible nombre d'animaux par lot.
Les résultats de l'analyse bactériologique des matières fécales ont indiqué une bonne implantation des deux *E. coli* CTX^R. En effet, sept jours après l'inoculation avec les souches CTX^R, 100% des porcs étaient porteurs d'entérobactéries résistantes au CTX. Ces observations ont confirmé les résultats des deux premiers essais sur la bonne implantation de la souche *E. coli* M63.
La quantification des probiotiques a montré une bonne implantation des probiotiques (10/15 pour ED1a et 15/15 pour Nissle) deux jours après le début de l'administration. Comme dans les deux précédents essais, le titre de la souche *E. coli* ED1a dans les matières fécales a diminué rapidement après la fin de l'administration. Mais le nombre de porcs porteurs du probiotique *E. coli* ED1a est resté important. Cette observation est également valable pour la souche *E. coli* Nissle.

Un jour après la fin de l'administration des probiotiques, une diminution significative du nombre d'entérobactéries CTX^R a été observée pour les porcs des animaleries ayant reçu la souche *E. coli* M63 par rapport aux porcs inoculés avec la souche *E. coli* TN03. Il semble que le gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ de résistance aux C3G présent dans la souche *E. coli* M63 d'origine porcine diffuse plus fréquemment comparé au gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ présent dans la souche *E. coli* TN03 d'origine humaine. En ciblant les porcs inoculés avec la souche *E. coli* M63, la diffusion du gène de résistance $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a été nettement moins fréquemment observée dans l'animalerie ayant reçu le probiotique *E. coli* Nissle. En effet, seulement deux isolats CTX^R (non M63) ont été collectés dans le lot B2 (M63 puis Nissle) contre 41 souches isolées du lot B1 (M63 puis ED1a). La diffusion du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ a été observée vers des *E. coli* de groupes phylogénétiques différents chez un même animal à différentes dates. Des isolats de mêmes profils de restriction et de même groupe phylogénétique ont été obtenus chez différents animaux. Nous n'avons pas détecté l'acquisition des gènes de résistance $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ ou $bla_{ctx\text{-}M\text{-}15}$ par le probiotique *E. coli* ED1a ou par la souche *E. coli* Nissle.
La faible sensibilité de la qPCR $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ n'a pas permis de mettre en évidence l'effet des probiotiques.

4- Conclusion des différents essais

Les trois essais réalisés ont permis de s'assurer de l'implantation des deux souches de *E. coli* résistantes aux C3G, l'une d'origine porcine (*E. coli* M63) et l'autre d'origine humaine (*E. coli* TN03), et deux souches d' *E. coli* utilisées comme probiotiques, *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle 1917. Les analyses bactériologiques et moléculaires réalisées au cours des essais ont montré une excrétion d'entérobactéries CTX^R plus importante chez certains porcs, et, au moins pour certains animaux de façon répétée.

Les protocoles ont cherché à mettre en évidence une éventuelle réduction de l'excrétion de la souche résistante inoculée ou de souches ayant acquis cette résistance aux C3G, chez les animaux recevant le probiotique comparés aux animaux ne le recevant pas. Globalement, dans nos conditions expérimentales, un impact favorable, limité mais significatif, de l'administration d'*E. coli* ED1a et d'*E. coli* Nissle sur l'excrétion dans les matières fécales est mis en évidence principalement pendant la période d'administration lorsque les porcs ont été inoculés avec souche *E. coli* M63. Pour un même inoculum d'*E. coli* M63, l'administration d'une plus forte dose de *E. coli* ED1a ne semble pas accroitre l'impact observé. Les échantillons de lisiers collectés dans les lots ayant reçu *E. coli* ED1a puis stockés à 4°C sont également moins fréquemment détectés positifs pour le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ que ceux des lots n'ayant pas reçu *E. coli* ED1a. Lors du second essai, le stockage à température ambiante a permis de ne plus mettre en évidence d'entérobactéries CTX^R après deux mois de stockage. Une synthèse des résultats concernant les effets de l'administration d'*E. coli* ED1a ou *E. coli* Nissle sur la population entérobactéries CTX^R chez les porcs inoculés avec *E. coli* M63 ou *E. coli* TN03 est reportée dans les tableaux de l'annexe 4.

Les différents essais ont également permis de mettre en évidence un transfert régulier du gène de résistance $bla_{\text{CTX-M-1}}$ vers d'autres souches d'*E. coli* du microbiote intestinal porcin. Il est également important de souligner l'absence de transfert de ce gène vers les deux souches de probiotiques (*E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle).

Discussion

La présence d'*E. coli* résistant aux C3G a été mise en évidence chez le porc ou chez les volailles, en élevage ou à l'abattoir ainsi que dans des denrées alimentaires d'origine animale, du fait de contaminations par des matières fécales des carcasses à l'abattoir (Anses 2010). Ces bactéries résistantes risquent également de contaminer l'environnement lors de l'épandage de lisiers ou de fumiers (EFSA 2011; Anses 2015). Cette résistance aux C3G est donc, non seulement une menace pour la santé animale, mais également devenue un problème majeur de santé publique.

Dans le cadre de ce projet, l'objectif principal était de diminuer le portage d'*E. coli* résistant aux C3G dans le microbiote intestinal porcin grâce un traitement par des probiotiques (*E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle). Pour cela, les modèles expérimentaux ont été basés sur la préparation d'une souche R- C3G (*E. coli* M63), obtenue par conjugaison d'une souche receveuse *d'E. coli* isolée de la flore intestinale de nos porcs EOPS avec une souche *E. coli* hébergeant le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$, codant la BLSE le plus fréquemment rencontrée dans les souches d'entérobactéries de porcs en France et dans de nombreux pays (Perrin 2011; Philipon 2013). La souche *E. coli* M63 appartient au même groupe phylogénétique que la souche receveuse utilisée, et présente des résistances aux C3G, au triméthoprime-sulfaméthoxasole et à la streptomycine, résistances portées sur le même plasmide. Les modèles expérimentaux réalisés pour ce projet ont consisté à étudier l'effet des probiotiques sur le portage d'entérobactéries résistantes aux C3G dans la flore intestinale porcine. Le traitement des échantillons de matières fécales de porcs a été réalisé par une analyse bactériologique, méthode déjà bien maîtrisée au sein de l'unité. La mise en place de tests par PCR quantitative au sein de l'unité a été nécessaire pour l'analyse moléculaire des échantillons de matières fécales de porcs et de lisiers.

Mise au point des différents tests de PCR quantitatives

La mise au point de la qPCR pour le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ a montré une sensibilité de diagnostic à 97,9% mais une limite de détection élevée (1×10^4 copies/µl), sans doute due au nombre limité de cycles (25 cycles).

Mais au-delà de ces 25 cycles, la spécificité était nettement moins bonne (résultat non montré). Malgré ce faible nombre de cycles, une amplification du gène $bla_{\text{CTX-M-9}}$ a été détectée.

Ce manque relatif de spécificité a été estimé sans impact pour ce projet car les essais expérimentaux ont été réalisés sur des porcs EOPS n'hébergeant pas de souche d'entérobactéries résistantes aux C3G, en dehors des souches inoculées ou des transconjugants, comme l'ont confirmé les analyses culturales sur milieux supplémentés.

Les résultats de la spécificité analytique pour la PCR *E. coli* en temps réel ont montré une amplification avec *Shigella* (16 Ct). La cible de cette PCR est le gène codant pour l'ARN 16S. Or, il existe 80-90 % de similarité nucléotidique entre *E. coli* et *Shigella*, avec un haut degré de parenté au niveau du gène codant l'ARN 16S (Ud-Din & Wahid 2014).

Suite à ce résultat, un alignement de la de la région du gène d'ARN 16S amplifié chez *E. coli* ED1a (N° accession : CU928162.2) été réalisé contre les gènes d'ARN16S (Bacteria and Archaea) (NCBI), indiquant un alignement de la séquence amplifiée contre des souches *E. coli* mais également des souches de *Shigella* avec 100% d'identité et des E-value proches de zéro. A titre d'exemple, *Shigella sonnei* (N° d'accession : NR-074894.1) indique 100% d'homologie avec le gène d'ARN 16S d'*E. coli* ED1a avec un E-value à 4×10^{-45}.

Discussion des résultats des protocoles expérimentaux

- Symptômes et croissance

L'épisode de diarrhée associée à rotavirus a été observée lors de deux expérimentations n°1 et n°3. Les porcs de l'essai 1 (*E. coli* M63) étaient alors âgés de 11 semaines soit 7 semaines après le sevrage et ceux de l'essai 3 (*E. coli* Nissle) étaient âgés de 9 semaines. Cependant des études ont montré que les diarrhées associées au rotavirus étaient le plus souvent observées chez les porcelets âgés de 1 à 41 jours ou pendant 7 jours après le sevrage. Mais ces troubles peuvent également être observés jusqu'à l'âge de 2 mois (Zimmerman J. 2012). Des difficultés respiratoire nommées plus communément « coups de flanc » ont été observés lors du 3ème essai au lendemain de l'inoculation des porcs avec la souche *E. coli* TN03 (lot TN03 puis *E. coli* Nissle), mais aucune lésion pulmonaire n'a été observée lors de l'autopsie de ces porcs. Cette souche appartient au clone pandémique *E. coli* O25b :H4-ST131, responsable d'infections extra-intestinales, le plus souvent des infections urinaires et des bactériémies (Pietsch *et al.* 2015).

Pour le premier essai, le lot témoin avait un gain de poids significativement supérieur de J0 à J27 par rapport au lot inoculé avec la souche *E. coli* M63. Cette différence peut être due à l'épisode de diarrhée à rotavirus dans le lot ayant reçu la souche *E. coli* M63 pendant la période J20 à J22. En effet, il a été montré que la diarrhée à rotavirus dans les élevages entrainait une réduction du gain de poids des animaux (Jacobi *et al.* 2013). Le rotavirus peut être transmis de la truie aux porcelets et ne fait pas partie de la liste des pathogènes spécifiés. Des facteurs de stress, tels que la séparation avec la truie, le changement du régime alimentaire interviennent lors du post-sevrage. Ces facteurs de stress peuvent influencer les fonctions immunitaires, pouvant conduire à des épisodes de diarrhée (Melin *et al.* 2004). Ces évènements sont difficilement maitrisables et reflètent la réalité du terrain.

Des différences significatives ont été également observées lors du dernier essai entre les animaux recevant les probiotiques *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle.

Une croissance plus importante a été observée chez les lots ayant reçu la souche *E. coli* ED1a comparé au lot témoin. Dans les élevages, l'utilisation de probiotiques semble entrainer une meilleure croissance des animaux (Hou *et al.* 2015). Une autre étude a montré que l'utilisation de *Bacillus subtilis* comme probiotique permettait une amélioration des performances des animaux (Guo *et al.* 2006).

Un gain de poids moins élevé chez les porcs ayant reçu le probiotique *E. coli* Nissle pourrait s'expliquer par la présence de diarrhée associée au rotavirus dans le lot seulement inoculé avec la souche *E. coli* Nissle.

Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution vu le faible effectif dans les différentes animaleries.

- Implantation des différentes souches

Les deux souches d'*E. coli* R-C3G utilisées dans les différentes expérimentations se sont bien implantées dans le microbiote intestinal porcin. La souche *E. coli* M63 utilisée lors des trois expérimentations semble être très adaptée au microbiote intestinal porcin et persiste dans tous les groupes jusqu'à la fin des essais. Ces résultats étaient attendus car cette souche a été préparée avec une souche receveuse issue de la flore intestinale d'animaux du même troupeau porcin.

La souche *E. coli* TN03 utilisée comme souche résistante aux C3G lors du dernier essai a montré une bonne implantation dans la flore intestinale porcine et a persisté jusqu'à la fin de l'essai (soit 20 jours après son inoculation). Vimont et *al*. ont montré que cette souche était capable de coloniser rapidement la flore intestinale des souris. Lors de cette étude, les auteurs ont également rapporté que cette souche avait un potentiel métabolique élevé, ce qui faciliterait son adaptation à différents environnements et probablement sa capacité à établir et à maintenir la colonisation intestinale (Vimont *et al.* 2012).

Les résultats ont également révélé que, comme observé précédemment pour la souche *E. coli* Nissle 1917 (Barth *et al.* 2009; Smajs *et al.* 2012) et pour la première fois pour la souche *E. coli* ED1a, les deux souches peuvent coloniser facilement le microbiote intestinal porcin. Une étude avait déjà montré que la souche *E. coli* ED1a pouvait coloniser la flore intestinale de souris (Vimont *et al.* 2012). Sur l'ensemble des trois essais, la détection moléculaire des probiotiques a été possible dès le début de l'administration et jusqu'à la fin de l'essai. La quantification moléculaire de ces probiotiques a révélé des titres plus importants pendant la durée du traitement. Lors du deuxième essai, une différence du niveau d'excrétion du probiotique *E. coli* ED1a a été observée lors de la période d'administration en fonction de la dose inoculée aux porcs. Sur cette même période, ces résultats ont également été observés dans les échantillons de lisier en fonction de la dose inoculée aux porcs.

- Impact des porcs super-excréteurs sur la dissémination de la résistance dans l'environnement

Dans les trois essais, certains porcs pouvaient excréter environ 2 logs de plus d'entérobactéries CTX^R par rapport aux autres porcs d'un même lot.

Nous avons considéré ces porcs comme des porcs super-excréteurs. Bearson et *al*. ont montré que l'inoculation de porcs avec une souche de salmonelle pouvait induire une modification de la maturation du microbiote intestinal porcin et certains porcs pouvaient excréter une quantité plus importante de salmonelles par rapport aux autres (Bearson *et al.* 2013).

Au Royaume-Uni, une étude réalisée dans des élevages porcins a montré une variabilité du nombre d'*E. coli* porteurs d'un gène bla_{CTX-M} entre les animaux. Les porcs ont donc pu été divisés en trois groupes en fonction de leur niveau d'excrétion d'*E. coli* porteurs d'un gène bla_{CTX-M}. Ces auteurs ont considéré qu'un niveau élevé d'excrétion d'*E. coli* producteurs de BLSE pouvait faciliter la dissémination des gènes bla_{CTX-M} dans les élevages d'animaux destinés à la consommation humaine (Horton *et al.* 2011). Une excrétion importante de ces bactéries résistantes favoriserait les transmissions inter-animaux, et serait à l'origine de plus fortes contaminations des denrées alimentaires d'origine animale à l'abattoir.

De plus, le lisier est un réservoir de bactéries résistantes qui peut être utilisé pour la fertilisation des sols et donc entrainer une dissémination de bactéries résistantes vers le sol et l'environnement (Heuer *et al.* 2011; Bhulibhamon G. 2012). Dans notre étude, nous avons réalisé une quantification des entérobactéries CTX^R sur des échantillons de lisier lors des deux premiers essais. Dans nos conditions expérimentales, le lisier représente un mélange des excréments et urines émis par tous les porcs pendant une semaine entière. Les prélèvements de lisier du premier essai ont été stockés à 5°C ± 3°C et ceux du deuxième essai ont été conservés à température ambiante. Après inoculation des animaux, les résultats indiquent, une présence importante d'entérobactéries CTX^R à T0, le jour du prélèvement. Une différence a été ensuite observée entre les deux modes de stockage ; le stockage à 5°C ± 3°C pendant 3 mois n'a pas permis de voir d'évolution majeure sur le titre d'entérobactéries CTX^R. Par ailleurs, les échantillons de lisiers stockés à température ambiante (20,7°C ± 2,3°C) pendant 2 mois ont donné des résultats négatifs en culture sur milieux supplémentés après deux mois de stockage. Ces résultats sont à prendre avec précaution car l'échantillonnage des lisiers ne reflète pas parfaitement la réalité des élevages, dans lesquels les lisiers sont généralement régulièrement réapprovisionnés et pour lesquels il y a probablement une différence dans la quantité ou la proportion d'isolats résistants. Toutefois, nos résultats sont en accord avec une étude réalisée en 2005 au Canada dans un élevage porcin qui a montré une diminution de la population *E. coli* dans le lisier stocké de juin à août (température de l'air : 21,8°C ± 0,5°C), alors que les prélèvements réalisés en mars, avril et mai (moyennes respectives de -2,3°C ; 7,8°C et 11,8°C) n'ont pas indiqué d'évolution sur la population d'*E. coli* (Duriez & Topp 2007).

- <u>Transfert de la résistance</u>

La caractérisation des isolats d'*E. coli* CTX^R des différents essais a permis de mettre en évidence le transfert du gène $bla_{CTX-M-1}$ présent dans la souche *E. coli* M63 vers d'autres souches *E. coli* du microbiote porcin. Dans les trois essais, le transfert du gène $bla_{CTX-M-1}$ a été observé chez les porcs environ une semaine après l'inoculation de la souche *E. coli* M63 dans les lots inoculés avec cette souche et traités ou pas avec le probiotique *E. coli* ED1a. L'analyse des isolats résistants aux C3G a montré qu'ils pouvaient appartenir à la plupart des différents groupes phylogénétiques A, F, B2, C, E, D et majoritairement B1 (isolats autres qu'*E. coli* M63). En effet, les proportions du groupe phylogénétique B1 pour les trois essais étaient de 55,8%, 51,1% et 58,5%.

La prévalence des souches *E. coli* commensales appartenant au groupe phylogénétique B1 est plus importante chez les vaches, les chèvres et les moutons. Dans cet article, les souches *E. coli* commensales d'origine porcine appartenaient principalement au groupe phylogénétique A (21/39) (Carlos *et al.* 2010). Une autre étude a regardé l'impact de l'âge des animaux sur la diversité des *E. coli* commensales dans la flore intestinale porcine. Les auteurs ont mis en évidence une prévalence plus importante du groupe phylogénétique B1 chez les porcelets au moment du sevrage (âgés de 6 à 8 semaines). Alors que chez les truies (âgées de 5 à 7 mois), le groupe phylogénétique le plus retrouvé est le groupe A (Bok *et al.* 2013). Nous n'avons pas étudié plus en détail les isolats résistants d'*E. coli* sensibles à la rifampicine. Pour vérifier que le transfert du gène $bla_{\text{CTX-M}}$ est le résultat d'une conjugaison, une PCR permettant l'identification du groupe plasmidique d'incompatibilité (Carattoli *et al.* 2005) pourrait être réalisée afin de savoir si le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ est également porté sur un plasmide du groupe I1 (comme chez *E. coli* M63) ou sur un autre plasmide. Une analyse des profils plasmidiques des isolats CTX^{R} Rif^{S} voire un séquençage des plasmides extraits de quelques isolats contenant le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ pourrait être réalisé et permettrait la comparaison avec le plasmide présent dans la souche *E. coli* M63. Il est important de souligner que le transfert du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$, depuis la souche inoculée *E. coli* M63 vers d'autres souches *E. coli*, dans la flore intestinale des porcs s'est produit en absence de pression de sélection antibiotique. Ce transfert a été détecté au moins une fois dans chaque parc de chaque animalerie. Certaines souches ayant acquis le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ semblaient particulièrement compétitives (plus compétitives que la souche *E. coli* M63), dans la mesure où elles ont été retrouvées en grand nombre dans les matières fécales. Par exemple, lors du dernier essai, à J20, dans l'animalerie où les porcs ont été inoculés avec *E. coli* M63 puis avec *E. coli* ED1a, seulement 35,3% (6/17) des isolats appartenaient à la souche *E. coli* M63. Lors du deuxième essai, nous n'avons pas observé de corrélation entre les groupes phylogénétiques des souches isolées à partir des matières fécales et celles isolées des prélèvements de lisier. Cette observation peut être due au fait que les colonies ont été choisies au hasard et au faible nombre ou bien révéler des capacités différentes de survie dans le lisier dans les conditions expérimentales.

Lors du dernier essai, le transfert du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ semble avoir été plus tardif (première observation à J13) et moins important (2 isolats non M63/86 sur l'ensemble de l'essai) dans le lot inoculé avec la souche *E. coli* puis traité avec le probiotique *E. coli* Nissle 1917 que dans le lot inoculé avec la souche *E. coli* M63 puis traité avec le probiotique *E. coli* ED1a.

Dans ce dernier lot, le transfert du gène de résistance a été observé à J7 (soit avant le traitement avec le probiotique) avec la détection du gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ dans 41 isolats (autres *E. coli* M63) sur 106 sur l'ensemble de l'essai. Le faible effectif (5 porcs) ne permet pas d'affirmer un effet positif du probiotique *E. coli* Nissle 1917 sur la limitation du transfert du gène de résistance $bla_{\text{CTX-M-1}}$. Par contre, nous n'avons pas observé de transfert du gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ présent dans la souche *E. coli* TN03 vers d'autres *E. coli* de la flore intestinale porcine. Ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer l'absence de transfert du gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ vers d'autres souches *d'E. coli* car, seulement cinq colonies maximum CTX^{R} par prélèvement de matière fécale ont été caractérisées.

Mais cela indique un transfert apparemment moins fréquent du plasmide ou du gène $bla_{CTX-M-15}$ par rapport au gène $bla_{CTX-M-1}$. Ce résultat peut être lié à l'origine de la souche *E. coli* TN03. En effet, celle-ci est d'origine humaine alors que la souche *E. coli* M63 est d'origine porcine.

Il est important de souligner l'absence apparente de transfert *in vivo* des gènes blaCTX-M du groupe 1 de la souche *E. coli* M63 vers les deux probiotiques, *E. coli* ED1a et *E. coli* Nissle 1917. Ces souches semblent donc être réfractaires à l'acquisition du plasmide présent dans *E. coli* M63, ce qui est rassurant car il est important que ces souches potentiellement utilisées comme probiotiques, et bonnes colonisatrices du microbiote porcin restent indemnes de gènes de BLSE.

- Evaluation de l'impact des probiotiques

Les résultats du premier essai montrent une différence significative concernant le titre d'entérobactéries CTX^R, le nombre de copies du gène $bla_{CTX-M-1}$ et le nombre d'échantillons positifs en PCR $bla_{CTX-M-1}$ chez les porcs ayant été inoculés avec le probiotique *E. coli* ED1a par rapport aux porcs n'ayant reçu que la souche *E. coli* M63. Ces résultats ont été principalement observés durant la période d'administration du probiotique. Cependant, la présence d'un porc super-excréteur dans l'animalerie non traité avec le probiotique a augmenté les risques de re-contamination des autres animaux du même parc et donc un second essai a été entrepris afin de confirmer ces premiers résultats. L'analyse moléculaire des prélèvements de lisier réalisés après l'administration du probiotique a révélé un nombre de prélèvements positifs pour le gène bla_{CTX-M1} plus important dans le lot non traité (7/13) avec le probiotique par rapport au lot traité (0/13).

Pour le deuxième essai, les résultats n'ont pas montré de différence significative sur le nombre d'entérobactéries CTX^R entre les groupes inoculés avec la souche *E. coli* M63 et traités ou non traités avec le probiotique *E. coli* ED1a. Seule une différence significative a été enregistrée à J10 pour l'analyse moléculaire du gène $bla_{CTX-M-1}$ dans les matières fécales entre le groupe ayant reçu le faible inoculum du probiotique *E. coli* ED1a et le groupe non traité. La quantification du gène $bla_{CTX-M-1}$ dans les prélèvements de lisier a montré un faible nombre d'échantillons positifs dans l'ensemble des lots et donc n'a pas permis d'observer d'impact des probiotiques.

L'analyse bactériologique des entérobactéries CTX^R présentes dans les lisiers a montré une meilleure sensibilité de la méthode par rapport à la qPCR du gène $bla_{CTX-M-1}$. En regardant par exemple le lot B2, aucun échantillon n'a été détecté positif en PCR pour le gène $bla_{CTX-M-1}$; alors que 6/9 échantillons testés de J8 à J27 se sont avérés positifs par l'analyse bactériologique. Sur l'ensemble du dernier essai, sur la base des dénombrements d'entérobactéries CTX^R et la détection du gène $bla_{CTX-M-1}$, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les probiotiques *E. coli* Nissle et *E. coli* ED1a. Ces résultats sont à prendre avec précaution, étant donné l'absence de lot témoin seulement inoculés avec les souches *E. coli* R-C3G.

Par contre, une diminution significative d'entérobactéries CTX^R a été observée chez les porcs inoculés avec la souche *E. coli* M63 par rapport à la souche *E. coli* TN03 un jour après l'arrêt du traitement avec les probiotiques par rapport aux prélèvements réalisés avant le début du traitement. Ces résultats sont à prendre avec précaution vu le faible effectif par lot. Les résultats des trois essais ont montré une faible variabilité, un effectif plus important pourrait peut-être permettre d'observer une différence plus significative sur l'action des probiotiques contre les *E. coli* R-C3G. Une étude réalisée sur des souris inoculées par voie orale a montré que la souche *E. coli* TN03 était plus compétitive que la souche *E. coli* ED1a (Vimont *et al.* 2012). Par ailleurs, lors de ce dernier essai sur porcs, le manque de sensibilité de la qPCR pour le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ a également été mis en évidence. La comparaison des résultats obtenus pour les lots B3 et B4 (TN03+Nissle et TN03+ED1a) à J20 par culture (10 positifs sur 10) ou par qPCR (1 positif sur 9) a montré que la culture était plus sensible.

Plusieurs travaux décrivent l'impact des probiotiques sur le portage de bactéries résistantes (*E. coli* ou entérocoques résistants à la vancomycine ou à l'ampicilline chez l'homme ou chez l'animal). Ainsi selon Crouzet et *al*. chez l'homme, deux études ont décrit un effet bénéfique des probiotiques, notamment *Lactobacillus rhamnosus* GG qui permettrait de réduire le niveau d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (VRE) dans le microbiote intestinal des patients. Cependant, plus récemment, l'utilisation de *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 n'a pas montré d'effet significatif sur la diminution de la colonisation des VRE dans le microbiote intestinal de patients humains. Toutefois, l'utilisation de cette souche s'est accompagnée d'une diminution du nombre d'*E. faecium* de type VanA dans les fèces d'animaux.

L'effet d'un mélange de plusieurs souches de probiotiques (*Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, et *L. salivarius*) contre des entérocoques résistant à l'ampicilline colonisateurs de l'intestin a été étudié et son administration n'a pas permis de réduire la colonisation intestinale chez l'homme par les entérocoques résistants. Chez les animaux, les résultats concernant l'effet bénéfique des probiotiques contre les VRE sont tout autant mitigés. En effet, l'utilisation du probiotique *E. faecium* SF68 ou de *Lactobacillus* spp. n'a pas entrainé d'effet sur le niveau de VRE dans la flore intestinale des souris. Par contre, une publication a rapporté un impact de l'utilisation de la souche *Lactobacillus lactis* MM19 à titre préventif sur la croissance des VRE dans le microbiote intestinal des souris (Crouzet *et al.* 2015).

Tannock et *al.* ont comparé l'effet d'un placebo ou du probiotique *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor) contre des *E. coli* multirésistantes présent dans le microbiote digestif chez des patients hospitalisés en centre de long séjour. Après cinq semaines de traitement, les auteurs n'ont pas observé de différence significative entre les groupes (Tannock *et al.* 2011). Ces observations décevantes concernant la capacité des probiotiques à diminuer ou exclure la présence des bactéries résistantes sont en quelque sorte contrebalancées par Nutio et *al*. qui observent une importante différence de prévalence des *E. coli* résistants dans la flore intestinale des poulets élevés en Finlande ou en Suède, alors que les origines et les modes d'élevage des animaux sont globalement très similaires entre les deux pays.

Ces auteurs ont émis l'hypothèse que cette différence pourrait être liée à l'utilisation très fréquente en Finlande du Broilact (Orion, Finlande), une préparation de bactéries lyophilisées provenant du microbiote intestinal de volailles adultes. Ce produit est généralement destiné aux poussins de un jour pour exclure les Salmonelles. Dans l'expérience décrite par les auteurs, les poussins ont reçu le mélange bactérien le jour de l'éclosion et le lendemain ils ont été inoculés avec une souche d'*E. coli* résistante aux C3G. L'étude a montré une réduction importante des bactéries résistantes chez les oiseaux recevant la préparation (Nuotio *et al.* 2013). En outre, Hofacre et *al*. ont rapporté que l'utilisation d'une flore de barrière commerciale a considérablement réduit la colonisation par la souche multi-résistante et pathogène *E. coli* O78 :K80 de l'intestin grêle, du gros intestin et des cæcums chez les volailles lors d'expérimentations (Hofacre *et al.* 2002). Cependant, dans ces derniers essais, la préparation a été donnée à des animaux d'un jour, ce qui a probablement amélioré l'effet de barrière et a donné lieu à un impact plus important sur la réduction de l'excrétion des souches résistantes qui ont été administrées par la suite. Dans nos conditions expérimentales, les probiotiques ont été administrés aux porcs, âgés de plusieurs semaines, après la souche *E. coli* M63 (bonne colonisatrice du microbiote intestinal porcin), rendant probablement la compétition entre les probiotiques et les *E. coli* CTX^R trop difficile.

Conclusions et perspectives

Trois essais différents ont été menés pour évaluer la capacité des probiotiques *E. coli* ED1a ou *E. coli* Nissle 1917 à réduire l'excrétion fécale d'entérobactéries CTX^R chez des porcs préalablement inoculés avec une souche de *E. coli* résistante aux C3G. Les deux souches d'*E. coli* CTX^R et les deux probiotiques ont montré une bonne capacité de colonisation du microbiote intestinal porcin. Le transfert du gène de résistance $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ présent dans la souche *E. coli* M63 vers d'autres souches d'*E. coli* présentes dans la flore intestinale a été établi. Les différentes expérimentations ont également montré la présence de porcs super excréteurs. Il serait intéressant de comparer les propriétés phénotypiques (vitesse de croissance dans différents milieux par exemple, capacité à former des biofilms…) et génétiques (séquences chromosomiques et plasmidiques) de plusieurs isolats de la souche résistante inoculée ou obtenus à différentes dates à partir de porcs super-excréteurs ou d'autres animaux afin de détecter des caractéristiques et/ou des mutations ou acquisitions d'éléments génétiques mobiles qui seraient *in vivo* susceptibles d'expliquer une meilleure compétitivité des isolats des animaux super-excréteurs. Les microbiotes intestinaux obtenus à différentes dates à partir de porcs super excréteurs et de leurs congénères pourraient être également séquencés afin de comparer leur composition bactérienne. Dans nos conditions expérimentales, l'administration des probiotiques n'a pas donné lieu à une diminution significative de l'excrétion des entérobactéries CTX^R sur l'ensemble de la période des essais. Un effet du probiotique a été seulement observé lors de la période du traitement. Cette étude va être poursuivie en testant d'autres conditions expérimentales. L'administration du probiotique va être effectuée à titre préventif. Ainsi, des truies vont être traitées avec le probiotique avant la mise bas puis jusqu'au sevrage, ainsi que leurs porcelets et les porcelets seront inoculés avec la souche *E. coli* M63 juste après leur sevrage. Les futures expérimentations permettront d'évaluer si ces nouvelles conditions expérimentales permettent d'obtenir une meilleure capacité des probiotiques à rivaliser avec les souches résistantes et à prévenir la colonisation par les *E. coli* productrices de BLSE. Si un impact bénéfique est observé, cette stratégie pourrait représenter une option pour les situations de terrain où des animaux exempts d'entérobactéries productrices de BLSE sont déplacés vers un environnement contaminé ou pour les animaux nouveau-nés ou encore pour réduire la contamination des denrées lors de l'abattage.

Bibliographies

Abraham S., Trott D.J., Jordan D., Gordon D.M., Groves M.D., Fairbrother J.M., Smith M.G., Zhang R. & Chapman T.A. (2014) Phylogenetic and molecular insights into the evolution of multidrug-resistant porcine enterotoxigenic Escherichia coli in Australia. *Int J Antimicrob Agents* **44**, 105-11.

Achenbach J. & Nierhaus K.H. (2015) The mechanics of ribosomal translocation. *Biochimie* **114**, 80-9.

AFSSA (2008) Avis du 15 juillet 2008 relatif aux souches d'Escherichia coli productrices de shigatoxines considérées comme pathogènes pour l'homme.

Ahmed A.M. & Shimamoto T. (2015) Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol* **193**, 68-73.

Ambler R.P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**, 321-31.

Anses-ANMV (2014) Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France 2013. Volumes et estimation de l'exposition des animaux aux antibiotiques. *www.anses.fr*.

Anses-ANMV (2015) Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France 2014. *www.anses.fr*.

Anses (2010) FARM 2007-2008, programme français de l'antibiorésistannce des bactéries d'origine animale. (www.anses.fr).

Anses (2014) Risques d'émergence d'antibiorésistances liés au modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. *www.anses.fr* **Auto-saisine num. 2011-SA-0071**.

Anses (2015) Réseau d'épidémiosurveillance de l'antiborésistance des bactéries pathogènes animales. bilan 2014.

Ashton F. (1990) Multilocus enzyme electrophoresis - Application to the study of meningococcal meningitis and listeriosis. *Can J Infect Dis* **1**, 146-8.

Barth S., Duncker S., Hempe J., Breves G., Baljer G. & Bauerfeind R. (2009) Escherichia coli Nissle 1917 for probiotic use in piglets: evidence for intestinal colonization. *J Appl Microbiol* **107**, 1697-710.

Bearson S.M., Allen H.K., Bearson B.L., Looft T., Brunelle B.W., Kich J.D., Tuggle C.K., Bayles D.O., Alt D., Levine U.Y. & Stanton T.B. (2013) Profiling the gastrointestinal microbiota in response to Salmonella: low versus high Salmonella shedding in the natural porcine host. *Infect Genet Evol* **16**, 330-40.

Bej A.K., DiCesare J.L., Haff L. & Atlas R.M. (1991) Detection of Escherichia coli and Shigella spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1013-7.

Bergey (1984) Systematic bacteriology. *Williams and Wilkins* **Volume 1**.

Bhulibhamon G. S.H. (2012) Transfer of resistance from pig manure to agricultural fields-A field study. In: *3RD ASM Conference on AMR in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens*, p. 35, Aix en Provence, France.

Bielaszewska M., Aldick T., Bauwens A. & Karch H. (2014) Hemolysin of enterohemorrhagic Escherichia coli: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. *Int J Med Microbiol* **304**, 521-9.

Bielaszewska M., Dobrindt U., Gartner J., Gallitz I., Hacker J., Karch H., Muller D., Schubert S., Alexander Schmidt M., Sorsa L.J. & Zdziarski J. (2007a) Aspects of genome plasticity in pathogenic Escherichia coli. *Int J Med Microbiol* **297**, 625-39.

Bielaszewska M., Prager R., Kock R., Mellmann A., Zhang W., Tschape H., Tarr P.I. & Karch H. (2007b) Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic Escherichia coli O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3144-50.

Bok E., Mazurek J., Pusz P., Stosik M. & Baldy-Chudzik K. (2013) Age as a factor influencing diversity of commensal E. coli microflora in pigs. *Pol J Microbiol* **62**, 165-71.
Brabban A.D., Hite E. & Callaway T.R. (2005) Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog Dis* **2**, 287-303.
Brugère H., Auvray F., Mariani-Kurkdjian P., King A. & Loukiadis E. (2012) E. coli producteurs de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* **50**, 23-8.
Bryskier (1999) *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*.
Bush K., Jacoby G.A. & Medeiros A.A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1211-33.
Canton R., Gonzalez-Alba J.M. & Galan J.C. (2012) CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* **3**, 110.
Caprioli A., Morabito S., Brugere H. & Oswald E. (2005) Enterohaemorrhagic Escherichia coli: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* **36**, 289-311.
Carattoli A. (2009) Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2227-38.
Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K.L. & Threlfall E.J. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**, 219-28.
Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A., Voldby Larsen M., Lund O., Villa L., Moller Aarestrup F. & Hasman H. (2014) In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 3895-903.
Carlos C., Pires M.M., Stoppe N.C., Hachich E.M., Sato M.I., Gomes T.A., Amaral L.A. & Ottoboni L.M. (2010) Escherichia coli phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol* **10**, 161.
Chaudhuri R.R. & Henderson I.R. (2012) The evolution of the Escherichia coli phylogeny. *Infect Genet Evol* **12**, 214-26.
Clermont O., Bonacorsi S. & Bingen E. (2000) Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4555-8.
Clermont O., Christenson J.K., Denamur E. & Gordon D.M. (2013) The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* **5**, 58-65.
Clermont O., Lavollay M., Vimont S., Deschamps C., Forestier C., Branger C., Denamur E. & Arlet G. (2008a) The CTX-M-15-producing Escherichia coli diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* **61**, 1024-8.
Clermont O., Lescat M., O'Brien C.L., Gordon D.M., Tenaillon O. & Denamur E. (2008b) Evidence for a human-specific Escherichia coli clone. *Environ Microbiol* **10**, 1000-6.
Courvalin (2012a) *Antibiogramme*.
Courvalin L. (2012b) Antibiogramme. In: (ed. by ESKA E).
Couturier M., Bex F., Bergquist P.L. & Maas W.K. (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* **52**, 375-95.
Crouzet L., Rigottier-Gois L. & Serror P. (2015) Potential use of probiotic and commensal bacteria as non-antibiotic strategies against vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol Lett* **362**, fnv012.
Croxen M.A. & Finlay B.B. (2010) Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**, 26-38.
D'Andrea M.M., Arena F., Pallecchi L. & Rossolini G.M. (2013) CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* **303**, 305-17.
Dobrindt U. (2005) (Patho-)Genomics of Escherichia coli. *Int J Med Microbiol* **295**, 357-71.
Dolezel J., Bartos J., Voglmayr H. & Greilhuber J. (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* **51**, 127-8; author reply 9.

Dudley E.G., Abe C., Ghigo J.M., Latour-Lambert P., Hormazabal J.C. & Nataro J.P. (2006) An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative Escherichia coli strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infect Immun* **74**, 2102-14.

Duriez P. & Topp E. (2007) Temporal dynamics and impact of manure storage on antibiotic resistance patterns and population structure of Escherichia coli isolates from a commercial swine farm. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5486-93.

EFSA (2011) The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal 2013;11(5):3196*.

EFSA (2014) The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal* **12 (3590)**.

Ellem J., Partridge S.R. & Iredell J.R. (2011) Efficient direct extended-spectrum beta-lactamase detection by multiplex real-time PCR: accurate assignment of phenotype by use of a limited set of genetic markers. *J Clin Microbiol* **49**, 3074-7.

EMA (2014) European surveillance of veterinary antimicrobial consumption, "sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. *European Medecines Agency* **(EMA/333921/2014) Fourth ESVAC report**.

Ewers C., Grobbel M., Stamm I., Kopp P.A., Diehl I., Semmler T., Fruth A., Beutlich J., Guerra B., Wieler L.H. & Guenther S. (2010) Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli among companion animals. *J Antimicrob Chemother* **65**, 651-60.

FAO/WHO (2001) WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 1-4.

Fekete P.Z., Brzuszkiewicz E., Blum-Oehler G., Olasz F., Szabo M., Gottschalk G., Hacker J. & Nagy B. (2012) DNA sequence analysis of the composite plasmid pTC conferring virulence and antimicrobial resistance for porcine enterotoxigenic Escherichia coli. *Int J Med Microbiol* **302**, 4-9.

Fleckenstein J.M., Hardwidge P.R., Munson G.P., Rasko D.A., Sommerfelt H. & Steinsland H. (2010) Molecular mechanisms of enterotoxigenic Escherichia coli infection. *Microbes Infect* **12**, 89-98.

Fleury M.A., Mourand G., Jouy E., Touzain F., Le Devendec L., de Boisseson C., Eono F., Cariolet R., Guerin A., Le Goff O., Blanquet-Diot S., Alric M. & Kempf I. (2015) Impact of ceftiofur injection on gut microbiota and Escherichia coli resistance in pigs. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 5171-80.

Fluit A.C. & Schmitz F.J. (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* **10**, 272-88.

Furet J.P., Firmesse O., Gourmelon M., Bridonneau C., Tap J., Mondot S., Dore J. & Corthier G. (2009) Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol* **68**, 351-62.

Girlich D., Poirel L., Carattoli A., Kempf I., Lartigue M.F., Bertini A. & Nordmann P. (2007) Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in Escherichia coli isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4681-5.

Gordon D.M., Clermont O., Tolley H. & Denamur E. (2008) Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* **10**, 2484-96.

Gordon D.M. & Cowling A. (2003) The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* **149**, 3575-86.

Gotz A., Pukall R., Smit E., Tietze E., Prager R., Tschape H., van Elsas J.D. & Smalla K. (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2621-8.

Guo X., Li D., Lu W., Piao X. & Chen X. (2006) Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of Bacillus subtilis MA139 in pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90**, 139-46.

Gyles C. & Boerlin P. (2014) Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol* **51**, 328-40.

Hacker J. & Carniel E. (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* **2**, 376-81.

Hacker J., Hochhut B., Middendorf B., Schneider G., Buchrieser C., Gottschalk G. & Dobrindt U. (2004) Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **293**, 453-61.

Hayashi T., Makino K., Ohnishi M., Kurokawa K., Ishii K., Yokoyama K., Han C.G., Ohtsubo E., Nakayama K., Murata T., Tanaka M., Tobe T., Iida T., Takami H., Honda T., Sasakawa C., Ogasawara N., Yasunaga T., Kuhara S., Shiba T., Hattori M. & Shinagawa H. (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**, 11-22.

Herold S., Karch H. & Schmidt H. (2004) Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol* **294**, 115-21.

Heuer H., Schmitt H. & Smalla K. (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* **14**, 236-43.

Ho N.K., Henry A.C., Johnson-Henry K. & Sherman P.M. (2013) Pathogenicity, host responses and implications for management of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection. *Can J Gastroenterol* **27**, 281-5.

Hofacre C.L., Johnson A.C., Kelly B.J. & Froyman R. (2002) Effect of a commercial competitive exclusion culture on reduction of colonization of an antibiotic-resistant pathogenic Escherichia coli in day-old broiler chickens. *Avian Dis* **46**, 198-202.

Holman D.B. & Chenier M.R. (2015) Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. *Can J Microbiol* **61**, 785-98.

Horton R.A., Randall L.P., Snary E.L., Cockrem H., Lotz S., Wearing H., Duncan D., Rabie A., McLaren I., Watson E., La Ragione R.M. & Coldham N.G. (2011) Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamase-producing escherichia coli in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol* **77**, 3715-9.

Hou C., Zeng X., Yang F., Liu H. & Qiao S. (2015) Study and use of the probiotic Lactobacillus reuteri in pigs: a review. *J Anim Sci Biotechnol* **6**, 14.

Huang Y., Shan X.F., Deng H., Huang Y.J., Mu X.P., Huang A.L. & Long Q.X. (2015) Epidemiology, Antimicrobial Resistance and beta-lactamase Genotypic Features of Enteropathogenic Escherichia coli Isolated from Children with Diarrhea in Southern China. *Jpn J Infect Dis* **68**, 239-43.

Jacobi S.K., Moeser A.J., Blikslager A.T., Rhoads J.M., Corl B.A., Harrell R.J. & Odle J. (2013) Acute effects of rotavirus and malnutrition on intestinal barrier function in neonatal piglets. *World J Gastroenterol* **19**, 5094-102.

Jaurin B. & Grundstrom T. (1981) ampC cephalosporinase of Escherichia coli K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4897-901.

Jehl C., Weber, Gérard (2004) *De l'antibiogramme à la prescription*.

Johnson J.R., Clermont O., Johnston B., Clabots C., Tchesnokova V., Sokurenko E., Junka A.F., Maczynska B. & Denamur E. (2014) Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within Escherichia coli sequence type 131. *J Clin Microbiol* **52**, 1358-65.

Johnson T.J., Bielak E.M., Fortini D., Hansen L.H., Hasman H., Debroy C., Nolan L.K. & Carattoli A. (2012) Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid* **68**, 43-50.

Juhas M. (2015) Horizontal gene transfer in human pathogens. *Crit Rev Microbiol* **41**, 101-8.

Kelly B.G., Vespermann A. & Bolton D.J. (2009) The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* **47**, 951-68.

Kempf I.J., E.; Granier, S.; Bruneau, M. (2014) L'antibiorésistance des bactéries isolées chez le porc (première partie). *Le nouveau praicien vétérinaire, élevages et snaté, 6 :189-194*.

Kenny M., Smidt H., Mengheri E. & Miller B. (2011) Probiotics - do they have a role in the pig industry? *Animal* **5**, 462-70.

Kohler C.D. & Dobrindt U. (2011) What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli? *Int J Med Microbiol* **301**, 642-7.

Lallès JP. K.S., Rothkötter H (2004) Bases physiologiques, microbiologiques et immunitaires des troubles digestifs du sevrage chez lz porcelet: données récentes dans le contexte de la suppression des antibiotiques additifs alimentaires. In: *Journées Recherche Porcine*, pp. 139-50, Paris.

LeMinor L.V., M. (1990) *Bactériologie Médicale*.

Lescat M., Clermont O., Woerther P.L., Glodt J., Dion S., Skurnik D., Djossou F., Dupont C., Perroz G., Picard B., Catzeflis F., Andremont A. & Denamur E. (2013) Commensal Escherichia coli strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environ Microbiol Rep* **5**, 49-57.

Macvanin M. & Adhya S. (2012) Architectural organization in E. coli nucleoid. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 830-5.

Maeda S., Ito M., Ando T., Ishimoto Y., Fujisawa Y., Takahashi H., Matsuda A., Sawamura A. & Kato S. (2006) Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 115-20.

Mainil J. (2013) Escherichia coli virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol* **152**, 2-12.

McWilliams B.D. & Torres A.G. (2014) EHEC Adhesins. *Microbiol Spectr* **2**, EHEC00032013.

Melin L., Mattsson S., Katouli M. & Wallgren P. (2004) Development of post-weaning diarrhoea in piglets. Relation to presence of Escherichia coli strains and rotavirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**, 12-22.

Meunier D., Jouy E., Lazizzera C., Kobisch M. & Madec J.Y. (2006) CTX-M-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical Escherichia coli isolates recovered from food-producing animals in France. *Int J Antimicrob Agents* **28**, 402-7.

Milani C., Ferrario C., Turroni F., Duranti S., Mangifesta M., van Sinderen D. & Ventura M. (2016) The human gut microbiota and its interactive connections to diet. *J Hum Nutr Diet*.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORET (2016) Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique. p. 3. Journal Officiel de la République Française.

Moodley A. & Guardabassi L. (2009) Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal Escherichia coli in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1709-11.

Morosini M.I., Valverde A., Garcia-Castillo M., Nordmann P. & Canton R. (2010) Persistent isolation of Salmonella Concord harbouring CTX-M-15, SHV-12 and QnrA1 in an asymptomatic adopted Ethiopian child in Spain also colonized with CTX-M-14- and QnrB-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* **65**, 1545-6.

Nataro J.P. & Kaper J.B. (1998) Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142-201.

Nordstrom K. (2006) Plasmid R1--replication and its control. *Plasmid* **55**, 1-26.

Nuotio L., Schneitz C. & Nilsson O. (2013) Effect of competitive exclusion in reducing the occurrence of Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases in the ceca of broiler chicks. *Poult Sci* **92**, 250-4.

Ochi S., Shimizu T., Ohtani K., Ichinose Y., Arimitsu H., Tsukamoto K., Kato M. & Tsuji T. (2009) Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic Escherichia coli Ent plasmid. *DNA Res* **16**, 299-309.

Ochman H. & Selander R.K. (1984) Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. *J Bacteriol* **157**, 690-3.

Ouellette M., Bissonnette L. & Roy P.H. (1987) Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7378-82.

Peirano G V.G.C., Pitout J. (2010) Characteristics of infections caused by extended-spectrum b-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from community hospitals in South Africa. In: *Forty-ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA., Boston.

Perrin A., Bruneau, M., Houee, P., Poirier, C., Kempf, I., Granier, S., Madec, J., Laurentie, M., and Sanders, P. (2011) 11 years of monitoring on third-generation-cephalosporins resistance in commensal *Escherichia coli* from food animals in France. In: *proceedings Antimicrobial resistance in animals and environment (tours, France)*.

Petit S., Richard,N, and Médard, F.H (2014) Dictionnaire des médicaments Vétérinaires 2014 et des produits de Santé Animale commercialisés en France (19e édition).

Pfeifer Y., Cullik A. & Witte W. (2010) Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* **300**, 371-9.

Philipon A. (2013) Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu(BLSE). *Immuno-analyse et biologie spécialisée (2013) 28, 287—296*.

Pietsch M., Eller C., Wendt C., Holfelder M., Falgenhauer L., Fruth A., Grossl T., Leistner R., Valenza G., Werner G., Pfeifer Y. & Group R.S. (2015) Molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. *Vet Microbiol*.

Poirel L., Bonnin R.A. & Nordmann P. (2012) Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol* **12**, 883-93.

Prescott H., Klein, (1995) *Microbiologie*.

Ravi A., Avershina E., Ludvigsen J., L'Abee-Lund T.M. & Rudi K. (2014) Integrons in the intestinal microbiota as reservoirs for transmission of antibiotic resistance genes. *Pathogens* **3**, 238-48.

Reis R.S. & Horn F. (2010) Enteropathogenic Escherichia coli, Samonella, Shigella and Yersinia: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog* **2**, 8.

Ribot E.M., Fair M.A., Gautom R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B. & Barrett T.J. (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* **3**, 59-67.

Robinson C.M., Sinclair J.F., Smith M.J. & O'Brien A.D. (2006) Shiga toxin of enterohemorrhagic Escherichia coli type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9667-72.

Rodrigues C., Machado E., Peixe L. & Novais A. (2013) IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse Escherichia coli clones from different piggeries. *J Antimicrob Chemother* **68**, 2245-8.

Rogers B.A., Sidjabat H.E. & Paterson D.L. (2011) Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* **66**, 1-14.

Sanders P., bousquet-Melou A., Chauvin C. & Toutain P. (2011) Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Prod.Anim.* **24(2), 199-204**.

Schembri M.A., Zakour N.L., Phan M.D., Forde B.M., Stanton-Cook M. & Beatson S.A. (2015) Molecular Characterization of the Multidrug Resistant Escherichia coli ST131 Clone. *Pathogens* **4**, 422-30.

Schmidt H., Bielaszewska M. & Karch H. (1999) Transduction of enteric Escherichia coli isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from Escherichia coli O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3855-61.

Seiffert S.N., Hilty M., Perreten V. & Endimiani A. (2013) Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resist Updat* **16**, 22-45.

Sekirov I., Russell S.L., Antunes L.C. & Finlay B.B. (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 859-904.

Servin A.L. (2014) Pathogenesis of human diffusely adhering Escherichia coli expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. *Clin Microbiol Rev* **27**, 823-69.

Smajs D., Bures J., Smarda J., Chaloupkova E., Kvetina J., Forstl M., Kohoutova D., Kunes M., Rejchrt S., Lesna J. & Kopacova M. (2012) Experimental administration of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 results in decreased diversity of E. coli strains in pigs. *Curr Microbiol* **64**, 205-10.

Stanton T.B. & Humphrey S.B. (2011) Persistence of antibiotic resistance: evaluation of a probiotic approach using antibiotic-sensitive Megasphaera elsdenii strains to prevent colonization of swine by antibiotic-resistant strains. *Appl Environ Microbiol* **77**, 7158-66.

Stenutz R., Weintraub A. & Widmalm G. (2006) The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 382-403.

Tannock G.W., Tiong I.S., Priest P., Munro K., Taylor C., Richardson A. & Schultz M. (2011) Testing probiotic strain Escherichia coli Nissle 1917 (Mutaflor) for its ability to reduce carriage of multidrug-resistant E. coli by elderly residents in long-term care facilities. *J Med Microbiol* **60**, 366-70.

Timofte D., Maciuca I.E., Kemmett K., Wattret A. & Williams N.J. (2014) Detection of the human-pandemic Escherichia coli B2-O25b-ST131 in UK dogs. *Vet Rec* **174**, 352.

Typas A., Banzhaf M., Gross C.A. & Vollmer W. (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* **10**, 123-36.

Ud-Din A. & Wahid S. (2014) Relationship among Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and their differentiation. *Braz J Microbiol* **45**, 1131-8.

Villa L., Garcia-Fernandez A., Fortini D. & Carattoli A. (2010) Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* **65**, 2518-29.

Vimont S., Boyd A., Bleibtreu A., Bens M., Goujon J.M., Garry L., Clermont O., Denamur E., Arlet G. & Vandewalle A. (2012) The CTX-M-15-producing Escherichia coli clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS One* **7**, e46547.

Wang X.M., Jiang H.X., Liao X.P., Liu J.H., Zhang W.J., Zhang H., Jiang Z.G., Lu D.H., Xiang R. & Liu Y.H. (2010) Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in Escherichia coli isolates from diseased pigs. *FEMS Microbiol Lett* **306**, 15-21.

WHO (2011) Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective. *www.euro.who.int*.

Wieler L.H., McDaniel T.K., Whittam T.S. & Kaper J.B. (1997) Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 49-53.

Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L.H., Karch H., Reeves P.R., Maiden M.C., Ochman H. & Achtman M. (2006) Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**, 1136-51.

Woodford N., Fagan E.J. & Ellington M.J. (2006) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother* **57**, 154-5.

WorldHealthOrganization (1999) Review of the Literature and Report of a WHO Workshop on the Development of a Global Strategy for the Containment of Antimicrobial Resistance. In: *Communicable Disease Surveillance and Response-Geneva, Switzerland, 4-5 February,*.

Xia P., Zou Y., Wang Y., Song Y., Liu W., Francis D.H. & Zhu G. (2015) Receptor for the F4 fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 4953-9.

Yu Z. & Morrison M. (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* **36**, 808-12.

Zhao S., White D.G., Ge B., Ayers S., Friedman S., English L., Wagner D., Gaines S. & Meng J. (2001) Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1558-64.

Zimmerman J. K.L., Ramirez A., Schwartz K., Stevenson G. (2012) *Diseases of swine*.

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des séquences nucléotidiques des amorces et de la taille des produits amplifiés utilisés pour les différentes PCR classiques

Nom de la PCR	Cibles	Nom des amorces	Séquences nucléotidiques	Taille des produits amplifiés
E. coli/ Shigella	***E. coli***	uidA1	5'-CTACACCACGCCGAATACC-3'	133 pb
		uidA2	5'-ATCCGCATCACGCAGTTC-3'	
	Shigella	ipaH1	5'-TCGCTGTTGCTGCTGATG-3'	101 pb
		ipaH2	5'-GCCTTCTGATGCCTGATGG-3'	
***E. coli* TN03**	***E. coli* TN03**	rfb.1bis	5'-ATACCGACGACGCCGATCTG-3'	300 pb
		rfbO25b.r	5'-TGCTATTCATTATGCGCAGC-3	
CTX-M	**CTX-M du groupe 1**	CTX-M1-F	5'-AAAAAATCACTGCGC CAGTTC-3'	415 pb
		CTX-M1-R	5'-AGCTTATTCATCGCCACGTT-3'	
	CTX-M du groupe 2	CTX-M2-F	5'-CGACGCTACCCCTGCTATT-3'	552 pb
		CTX-M2-R	5'-CCAGCGTCAGATTTTTCAGG-3'	
	CTX-M du groupe 9	CTX-M9-F	5'-CAAAGAGAGTGCAACGGATG-3'	205 pb
		CTX-M9-R	5'-ATTGGAAAGCGTTCATCACC-3'	
	CTX-M du groupe 8	CTX-M8-F	5'-TCGCGTTAAGCGGATGATGC-3'	666 pb
		CTX-M8/25-R	5'-AACCCACGATGTGGGTAGC-3'	
	CTX-M du groupe 25	CTX-M25-F	5'-GCACGATGACATTCGGG-3'	327 pb
		CTX-M8/25-R	5'-AACCCACGATGTGGGTAGC-3'	

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des séquences nucléotidiques des amorces et des sondes utilisés pour les différentes PCR en temps réel

PCR	Nom des amorces	Séquences nucléotidiques
E. coli	***E. coli* F**	5'-CATGCCGCGTGTATGAAGAA-3'
	***E. coli* R**	5'-CGGGTAACGTCAATGAGCAAA-3'
	Sonde *E .coli*	[6FAM]TATTAACTTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAA[BHQ1]
CTX-M G1	**CTX-M G1.F**	5'-GGAATCTGACGCTGGGTAAA-3'
	CTX-M G1.R	5'GGTTGAGGCTGGGTGAAGTA-3'
	Sonde CTX-M G1	[FAM]ACTATGGCACCACCAACGAT[BHQ-1]
***E. coli* ED1a**	**BD-L**	5'-GAACCGAATGGGATTTACAGGAA-3'
	BD-R	5'-AAGATAGCTGCTAATGCTTCAAG-3'
	Sonde BD	[FAM]ACCACTGCCGTTGGGA [BHQ1]
***E. coli* Nissle 1917**	**PM2-5011F**	5'- CGCCAAACACTGGAATATGT-3'
	PM2-5081R	5'-CATCCTCGGTCAGCAAAACC-3'
	Sonde Pmut2-5036S	[CY5]CAAAGCGGACGTTTGCCGTTC[BHQ1]

Annexe 3: Récapitulatif des différents programmes de PCR classique

	Composition du mix	Programme PCR	Témoins utilisés
PCR *E. coli*	Volume réactionnel : 50 µl 0,3 µM/amorce dNTP : 0,2 mM Tampon Go taq polymérase Flexi (Promega, Illkirch, France) : 1X $MgCl_2$ Flexi (Promega): 2mM Taq polymérase Flexi (Promega) : 1,25 UI ADN : 5µl	Dénaturation initiale : 94°C ; 5 min Dénaturation : 94°C ; 30 s Hybridation : 57°C ; 30 s Elongation : 72°C ; 30 s Elongation finale : 72°C ; 8min Nombre de cycles : 30	*E. coli* ED1a *Shigella sonnei* CIP 2249
PCR CTX-M	Volume réactionnel : 25 µl 0.35 µM/amorce dNTP : 0.2 mM $MgCl_2$ (Invitrogen): 1.5 mM Tampon (Invitrogen): 2.5 X Tampon W1 (Invitrogen): 1.25 X Taq polymérase (Invitrogen) : 0.125 UI ADN : 2µl	Dénaturation initiale : 94°C ; 5 min Dénaturation : 94°C ; 25 s Hybridation : 55°C ; 40 s Elongation : 72°c ; 50 s Elongation finale : 72°c ; 6min Nombre de cycles : 30	*E. coli* UB/03/235 (gène bla_{CTX-M1}) Salmonella Virchow 58-67 Holland (bla_{TEM-1b}, $bla_{CTX-M-2}$, SHV) *S.* Virchow 75-22438-1 Vagtel (gène $bla_{CTX-M-9}$)
PCR *E. coli* TN03	Volume réactionnel : 50 µl 0.5 µM/amorce dNTP : 0.2 mM Tampon Go taq polymérase Flexi (Promega) : 1X MgCl2 Flexi (Promega): 2mM Taq polymérase Flexi (Promega) : 1.25 UI ADN : 5µl	Dénaturation initiale : 95°C ; 2 min Dénaturation : 95°C ; 60 s Hybridation : 60°C ; 60 s Elongation : 72°C ; 35 s Elongation finale : 72°C ; 5min Nombre de cycles : 30	*E. coli* TN03 *E. coli* CIP 7624

Un témoin négatif a également été utilisé pour toutes les PCR. Pour cela, l'ADN est remplacé par 1µl d'eau « DNAfree » (Eurobio, Courtaboeuf, France).Suite à cette réaction PCR, les amplicons ont été déposés sur gel d'agarose à 2%. Une migration a été conduite pendant 90 min à 150 volts. Une coloration dans du Bromure d'éthidium (BET) (Eurobio) a été ensuite réalisée pendant 30 minutes. La lecture du gel a été réalisée sous UV.

Annexe 4: Récapitulatif des différents programmes de PCR temps réel

	Composition du mix	Programme PCR	Témoins utilisés
PCR *E. coli*	Volume réactionnel : 10 µl Amorces F : 0,3 µM Amorces R : 0,3 µM Sonde : 0,1µM Taq polymérase *:5µl ADN : 1µl	Dénaturation initiale : 95°C ; 10 min Dénaturation : 95°C ; 30 s Hybridation : 60°C ; 1 min Nombre de cycles : 40	*E. coli* ED1a
PCR CTX-M-Grp1	Volume réactionnel : 20 µl Amorces F : 0.2 µM Amorces R : 0.2 µM Sonde : 0.05 µM Taq polymérase *:10 µl ADN : 3 µl	Dénaturation initiale : 95°C ; 5 min Dénaturation : 95°C ; 20 s Hybridation : 56°C ; 35 s Elongation : 72°C ; 35 s Nombre de cycle : 25	*E. coli* UB/03/235
PCR ED1a	Volume réactionnel : 10 µl Amorces F : 0.1 µM Amorces R : 0.1 µM Sonde : 0.2µM Taq polymérase *:5 µl ADN : 1µl	Dénaturation initiale : 95°C ; 5 min Dénaturation : 95°C ; 30 s Hybridation : 60°C ; 1 min Nombre de cycle : 40	*E. coli* ED1a
PCR Nissle	Volume réactionnel : 25 µl Amorces F : 0.3 µM Amorces R : 0.3 µM Sonde : 0.2 µM Taq polymérase *:12.5 µl ADN : 2µl	Dénaturation initiale : 95°C ; 10 min Dénaturation : 95°C ; 15 s Hybridation : 60°C ; 1 min Nombre de cycle : 40	*E. coli* Nissle

* La Taq polymérase utilisée lors des différentes PCR en temps réel est présente dans un mélange réactionnel commercial : TaqMan Universal PCR Mastermix (KCl 50 mM ; Tris-HCl 20 mM, $MgCl_2$ 3 mM [pH 8,4], 800 µM de chacun des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), 0,625 unités de *Taq* polymérase, stabilisateurs) (BioRad).

Un témoin négatif a également été utilisé pour toutes les PCR. Pour cela, l'ADN est remplacé par 1µl d'eau « DNAfree » (Eurobio,). La collecte des données de fluorescence et l'analyse des données ont été réalisées avec le logiciel CFX manager 3.0 (Biorad)

Annexe 5: Typage phylogénétique

Tableau 1: Cadre de lecture des résultats de PCR Quadruplex pour affecter aux groupes phylogénétiques

Cibles	PROFILS									Nombre de paires de bases
chuA.2 + Acek.f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**476**
arpA	+	+	-	-	-	-	+	+	+	**400**
chuA	-	-	+	+	+	+	-	+	+	**288**
yjaA	-	-	-	+	+	-	+	-	-	**211**
TspE4.C2	-	+	-	-	+	+	-	+	-	**152**
Groupes	**A**	**B1**	**F**	**B2**			**A ou C**	**D ou E**		

Tableau 2: Séquences nucléotidiques et différents paramètres nécessaire pour les PCR des groupes A ou C et des groupes D et E

	séquences		Taille de l'amplicon (pb)	Composition du mix	Programme PCR
Groupe A ou C	ArpAdel.f : GAATTATTTGCC AGGAGGAG	ArpAdel.r : TGCTAATGGCAA TTGGTCAG	211 (groupe C) 823 (groupe A)	Volume réactionnel : 23 µl 0,52 µM (ArpAdel) ; 0.87 µM (uidA) dNTP : 0.2 mM Tampon Go Taq polymérase Flexi (Promega) : 1X $MgCl_2$ Flexi (Promega) : 1X Taq polymérase Flexi (Promega) : 1.25 UI ADN : 3µl	Dénaturation initiale : 94°C ; 4 min Dénaturation : 94°C ; 30 s Hybridation : 55°C ; 30 s Elongation : 72°c ; 30 s Elongation finale : 72°C ; 5min Nombre de cycles : 30
	uidA.f : CATTACGGCAAA GTGTGGGTCAAT	uidA.r : CCATCAGCACGT TATCGAATCCTT	657 (contrôle interne*)		
Groupe D ou E	ArpAgpE.f : GATTCCATCTTGT CAAAATATGCC	ArpAgpE.r : GAAAAGAAAAA GAATTCCCAAGA G	301 (groupe E)	0.87 µM de chaque amorce Les autres conditions sont identiques à la PCR du groupe A ou C	Dénaturation initiale : 94°C ; 4 min Dénaturation : 94°C ; 5 s Hybridation : 57°C ; 20 s Elongation finale : 72°C ; 5min Nombre de cycles : 30
	uidA.f : CATTACGGCAAA GTGTGGGTCAAT	uidA.r : CCATCAGCACGT TATCGAATCCTT	657 (contrôle interne*)		

Le gène *uidA* est présent chez souches appartenant au genre *Escherichia*

Annexe 6: Synthèse des résultats concernant les effets de l'administration d'*E. coli* ED1a ou *E. coli* Nissle sur la population entérobactéries CTX^R chez les porcs inoculés avec *E. coli* M63 ou *E. coli* TN03

Tableau 1 : Synthèse des résultats du 1er essai et du 2ème essai

Essai	Dose *E. coli* M63 (UFC/ml)	Titre *E. coli* ED1a (UFC/ml)		Impact sur matières fécales		Impact sur lisiers	
			lots	Analyses bactériologiques (entérobactéries CTX^R)	Analyses moléculaires (gène $bla_{CTX-M-1}$)	Analyses bactériologiques (entérobactéries CTX^R)	Analyses moléculaires (gène $bla_{CTX-M-1}$)
1	7,8 x10^8	2,76 x 10^8 Et 6,03 x 10^8	**A1 :** Témoin **A2 :** *E. coli* M63 **A3 :** *E. coli* M63 + *E. coli* ED1a	•Effet significatif à J10 (*P*=0,048), J13 (*P*=0,058) et sur l'ensemble de la période (*P*=0,01)	•Effet significatif sur les nombres de copies à J10 (*P*=0,003), J13 (*P*=0,004) et J17 (*P*=0,03) •Effet significatif sur le nombre total d'échantillons positifs à partir de la période d'administration (*P*<0,001)	Conservation à +4°C : • pas d'effet	Conservation à +4°C : • Effet significatif sur le nombre d'échantillons positifs après l'administration du (*P*=0,005)
2	7,03*10^7	Faible dose : 7,4 x 10^7 Forte dose : 6,5 x 10^8	**B1 :** Témoin **B2 :** *E. coli* M63 **B3 :** *E. coli* M63 + *E. coli* ED1a (faible dose) **B4 :** *E. coli* M63 +*E. coli* ED1a (forte dose)	•Pas d'impact	• A J10 : différence significative sur le nombre de copies entre B3 et B2 (*P*=0,01) ; tendance pour B3 et B4 (*P*=0,08) • nombres de prélèvements positifs ~~significativement~~ différents entre B4 et B2 (*P* >0,05). Pas de différence entre B2 et B3	Conservation à T°C ambiante • Échantillons négatifs après deux mois de stockage	•Pas de différence significative des nombres d'échantillons positifs entre les lots

Tableau 2 : Synthèse des résultats du 3ème essai

Essai	Dose *E. coli* M63 et *E. coli* TN03 (UFC/ml)	Titre *E. coli* et *E. coli* Nissle ED1a (UFC/ml)	lots	Impact sur matières fécales	
				Analyses bactériologiques (entérobactéries CTX^R)	**Analyses moléculaires (gène $bla_{CTX-M-1}$)**
3	*E. coli* M63 : 78 x10^9 *E. coli* TN03 : 68 x 10^9	*E. coli* ED1a : de 2,85 x 10^9 à 16,3x 10^9 *E. coli* Nissle : de 6,6 x 10^9 à 23,3 x 10^9	**F1 :** Témoin **F2 :** *E. coli* ED1a **F3 :** *E. coli* Nissle **B1 :** *E. coli* M63 + *E. coli* ED1a **B2 :** *E. coli* M63 + *E. coli* Nissle **B3 :** *E. coli* TN03 + *E. coli* ED1a **B4 :** *E. coli* TN03 + *E. coli* Nissle	•Quantité inférieure à J13 (fin du traitement par le probiotique) pour les B1 (P>0,05) et B2 (P>0,05) par rapport à J7. Pas de différence pour les lots B3 et B4	• Peu détecté

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Étude de l'impact de probiotique sur la réduction d'*E. coli* résistant aux céphalosporines de troisième génération dans le microbiote intestinal porcin

Gwénaëlle Mourand

Résumé :

Les antibiotiques sont utilisés depuis de nombreuses années chez les animaux ainsi que chez l'homme entrainant une augmentation de l'antibiorésistance. Parmi les antibiotiques jugés critiques pour la santé humaine, figurent les céphalosporines de troisième génération (C3G). A partir des années 2000, des Entérobactéries résistantes aux C3G ont été détectées chez les animaux. L'émergence de ces Entérobactéries résistantes est souvent due à l'acquisition de gènes codant pour la production de β-lactamases à spectre étendu (BLSE). Ces souches productrices de BLSE peuvent être pathogènes pour l'animal ou être simplement présentes dans le microbiote intestinal. Des études en France ou à l'étranger ont permis de mettre en évidence la présence d' *E. coli* résistants aux C3G chez le porc ou chez les volailles, en élevage ou à l'abattoir ainsi que dans des denrées alimentaires d'origine animale, du fait de contaminations par des matières fécales des carcasses à l'abattoir. Ces bactéries résistantes risquent également de contaminer l'environnement lors de l'épandage de lisier ou de fumier. La résistance aux C3G est donc, non seulement une menace pour la santé animale, mais est également devenue un problème majeur de santé publique.

Ce projet a pour but de contrecarrer la sélection d'*E. coli* résistants aux C3G dans le microbiote intestinal des porcs, en leur administrant des probiotiques. Pour cela, trois protocoles expérimentaux ont été réalisés sur des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés. Ces porcs ont été dans un premier temps inoculés par voie orale avec une souche *E. coli* résistant aux C3G (*E. coli* M63), inoculation suivie ou non de l'administration d'une souche d'*E. coli* non résistante et fortement colonisatrice, utilisée comme probiotique, ici *E. coli* ED1a ou *E. coli* Nissle.

Globalement, dans nos conditions expérimentales, nous avons constaté que l'administration d'*E. coli* ED1a, réduisait l'excrétion de souches résistantes mais seulement pendant la durée du traitement.

Malgré ces résultats décevants, les essais ont permis de développer un modèle de portage d'une souche de *E. coli* résistante aux C3G et de mettre en évidence la bonne implantation des deux souches de probiotiques et leur apparente capacité à être réfractaire à l'acquisition du plasmide de résistance aux C3G de la souche M63.

Mots-clés : Antibiorésistance, Céphalosporine de troisième génération, probiotique, *E. coli*, microbiote intestinal porcin