

## **Résistance des campylobacters aux antibiotiques**

Les antibiotiques sont des substances naturelles produites par des micro-organismes, ayant une activité sur d'autres bactéries. Au sens large, on y inclut également les antibactériens de synthèse (Anonymous 2006).

### **6.1 Définition de la résistance**

La résistance est un terme fréquemment employé dont la définition fait l'objet de nombreuses discussions. La résistance des bactéries aux antibiotiques se définit par rapport à :

- une population de référence, c'est à dire l'espèce bactérienne à laquelle appartient la souche étudiée (Heinzel 1998; Russell 1999; Davison, Low et al. 2000; Sidhu, Sorum et al. 2002; Cloete 2003; Gilbert and McBain 2003; Russell 2003; Bore and Langsrud 2005),
- un stress qui est la molécule antibiotique étudiée à une concentration fixée dans le milieu (Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003; Russell 2003)
- un contexte qui correspond à la méthode d'étude de la résistance, c'est à dire au point de vue soit du clinicien, du pharmacologiste, du microbiologiste ou de l'épidémiologiste (Davison, Low et al. 2000; Gilbert and McBain 2003; Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003; Soumet, Ragimbeau et al. 2005). La sensibilité, la spécificité, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode doivent être connues
- une valeur seuil qui est fonction de la méthode d'étude (succès thérapeutique, concentrations d'antibiotiques, diminution de la population bactérienne...) (Sudheim, Langsrud et al. 1998; Cloete 2003; Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003; Bore and Langsrud 2005)
- Enfin, la méthode d'échantillonnage doit être précisée, en indiquant comment les échantillons sont prélevés soit parmi les bactéries, soit dans la population hôte soit dans l'environnement (Davison, Low et al. 2000).

En fonction des méthodes d'étude de la résistance, plusieurs définitions sont données (Anonymous 2006) :

- pour le clinicien, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace
- pour le pharmacologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si les concentrations atteintes au site d'action sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice
- pour le microbiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice
- pour l'épidémiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle a une concentration minimale inhibitrice significativement différente de celle de la population normale

## 6.2 Détection de la résistance aux antibiotiques

### 6.2.1 Méthodes d'étude de la résistance aux antibiotiques

Les méthodes utilisées pour évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques sont cruciales pour les résultats et l'évaluation de la résistance (Kummerer 2004).

#### 6.2.1.1 Méthodes traditionnelles

Les méthodes conventionnelles nécessitent l'isolement en culture pure des bactéries à étudier, et la réalisation d'essais au cours desquels les bactéries sont exposées à différentes concentrations d'antibiotiques sous des conditions de croissance précises. L'aptitude des antimicrobiens à inhiber la croissance des bactéries est déterminée. Ces méthodes visent à déterminer une concentration minimale inhibitrice (CMI). Par définition (OMS), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée (Euzéby 2003). La nécessité de standardiser les méthodes de mesure des CMI date de la fin des années 70. En 1975, le comité américain NCCLS (National committee for clinical laboratory standards) éditent des lignes directrices pour la réalisation des essais de mesure des CMI (NCCLS 2002; NCCLS 2003). En Europe, il existe 6 systèmes nationaux de standardisation : en Suisse, en Allemagne, aux Pays-Bas, au Royaume-Uni, en France, et les standards du CLSI (anciennement NCCLS) sont repris dans certains pays européens (Wheat 2001).

La standardisation porte sur (Andrews 2001) :

- les solutions d'antibiotiques
  - la préparation des solutions conservées
  - les préparations des gammes de dilution
- les milieux de culture (gélose ou bouillon)
- la préparation des *inoculi* bactériens
- les souches de bactéries utilisées pour le contrôle qualité
- les conditions d'inoculation des milieux de culture
- les conditions d'incubation
- la lecture et l'interprétation des résultats

L'objectif de la standardisation est d'assurer la qualité des résultats obtenus et de pouvoir les comparer entre laboratoires ou entre pays utilisant les mêmes méthodes d'étude de la résistance.

Les méthodes traditionnelles d'étude de la résistance chez *Campylobacter* sont les suivantes :

- les méthodes de diffusion des antibiotiques à partir de disques de papier buvard.

Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance de migration par rapport au disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe (Euzéby 2003). Les méthodes de diffusion sont utilisées par le laboratoire de diagnostic et permettent la mesure des diamètres d'inhibition qui peuvent être comparés au seuil critique utilisé pour le classement des bactéries.

- les méthodes de dilution en milieu liquide ou gélosé

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide (gélose). Elles consistent à mettre un *inoculum* bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotique.

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

En milieu solide, l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Petri. La surface de la gélose est ensemencée avec un *inoculum* des souches à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.

Les techniques de dilution en milieu gélosé permettent également de mesurer la concentration inhibitrice 99 p. cent (concentration qui inhibe la croissance de 99 p. cent des cellules d'une souche bactérienne) ou la concentration inhibitrice 50 p. cent (concentration qui inhibe la croissance de 50 p. cent des cellules d'une souche bactérienne) (Euzéby 2003).

- Choix des seuils : Les méthodes traditionnelles d'étude de la résistance donnent des résultats qui nécessitent la définition d'une valeur seuil.

En fonction des objectifs de l'étude de la résistance, des valeurs seuils différentes peuvent être retenues. La confrontation de la CMI à des seuils (concentrations critiques) permet de classer la bactérie comme sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R). Des recommandations méthodologiques et la définition des concentrations critiques sont faites par des comités nationaux. Il n'existe pas de norme internationale. En France, ces valeurs critiques sont fixées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM 2007). Ces valeurs définissent des catégories cliniques.

**Tableau 9. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Campylobacter* spp. (CA-SFM 2007)**

| Antibiotique                  | Charge du disque | Concentrations critiques (mg/L) |        | Diamètres critiques (mm) |      | Remarques                                                  |
|-------------------------------|------------------|---------------------------------|--------|--------------------------|------|------------------------------------------------------------|
|                               |                  | S                               | R      | S                        | R    |                                                            |
| Ampicilline                   | 10 µg            | ≤ 4                             | > 16   | ≥ 19                     | < 14 | Cf règle (1).                                              |
| Amoxicilline/ac. clavulanique | 20/10 µg         | ≤ 4/2                           | > 16/2 | ≥ 21                     | < 14 | Cf règle (1).                                              |
| Céfalcone (H)                 | 30 µg            | ≤ 8                             | > 32   | ≥ 18                     | < 12 | Cf règle (1).                                              |
| Céfotaxime (H)                | 30 µg            | ≤ 4                             | > 32   | ≥ 21                     | < 15 | Cf règle (1).                                              |
| Streptomycine                 | 10 UI            | ≤ 8                             | > 16   | ≥ 15                     | < 13 | Cf règles (1) et (2).                                      |
| Gentamicine                   | 15 µg (10 UI)    | ≤ 2                             | > 4    | ≥ 18                     | < 16 | Cf règles (1) et (2).                                      |
| Kanamycine                    | 30 UI            | ≤ 8                             | > 16   | ≥ 17                     | < 15 | Cf règles (1) et (2).                                      |
| Tobramycine                   | 10 µg            | ≤ 2                             | > 4    | ≥ 18                     | < 16 | Cf règles (1) et (2).                                      |
| Erythromycine                 | 15 UI            | ≤ 1                             | > 4    | ≥ 22                     | < 17 | Cf règles (1). Interprétation valable pour clarithromycine |
| Acide nalidixique             | 30 µg            | ≤ 8                             | > 16   | ≥ 20                     | < 15 | Cf règle (1).                                              |
| Ciprofloxacine                | 5 µg             | ≤ 0,5                           | > 1    | ≥ 25                     | < 22 | Cf règle (1).                                              |
| Tétracycline                  | 30 UI            | ≤ 4                             | > 8    | ≥ 19                     | < 17 |                                                            |
| Chloramphénicol               | 30 µg            | ≤ 8                             | > 16   | ≥ 23                     | < 19 |                                                            |

(H) – Antibiotique distribué en milieu hospitalier

#### Règles de lecture interprétative

Remarques : selon les antibiotiques, la corrélation entre CMI et diamètres est parfois difficile à établir. En cas de doute sur les résultats obtenus par diffusion en milieu gélosé, il y a lieu de déterminer les CMI par une méthode de référence ou toute méthode ayant montré, pour les antibiotiques concernés, son équivalence avec la méthode de référence.

(1) Pour *Campylobacter* spp., une absence de zone d'inhibition autour des disques de β-lactamines, aminosides, macrolides ou quinolones traduit une résistance de haut niveau.

(2) Compte tenu des conditions d'incubation (anaérobiose ou microaérobiose), les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'aminosides sont toujours réduits.

**Tableau 10. Cut-off épidémiologiques proposés par l'EUCAST pour *C. jejuni* et *C. coli* (Anonymous 2007)**

| Antibiotiques                                                      | Nombre<br>d'observations | C. jejuni<br>Sources de<br>données | Cut-off<br>épidémiologique | Nombre<br>d'observations | C. coli<br>Sources de<br>données | Cut-off<br>épidémiologique |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Macrolides<br>(érythromycine,<br>clarithomycine,<br>azithromycine) | 1424                     | 17                                 | ≤ 4 mg/l                   | 2087                     | 17                               | ≤ 16 mg/l                  |
| (Fluoro)quinolones                                                 |                          |                                    |                            |                          |                                  |                            |
| ciprofloxacine                                                     | 1023                     | 16                                 | ≤ 1 mg/l                   | 2532                     | 17                               | ≤ 1 mg/l                   |
| acide nalidixique                                                  | 1082                     | 12                                 | ≤ 16 mg/l                  | 1824                     | 15                               | ≤ 32 mg/l                  |
| Tétracycline                                                       | 808                      | 8                                  | ≤ 2 mg/l                   | 1280                     | 11                               | ≤ 2 mg/l                   |
| Aminoglycosides                                                    |                          |                                    |                            |                          |                                  |                            |
| Streptomycine                                                      | 514                      | 10                                 | ≤ 2mg/l                    | 894                      | 8                                | ≤ 4 mg/l                   |
| Gentamicine                                                        | 1151                     | 12                                 | ≤ 16 mg/l                  | 1915                     | 15                               | ≤ 2 mg/l                   |
| Pénicillines                                                       |                          |                                    |                            |                          |                                  |                            |
| Amoxicilline                                                       | 401                      | 5                                  | ≤ 16 mg/l                  | 800                      | 6                                | ≤ 8 mg/l.                  |
| ampicilline                                                        | 808                      | 8                                  | ≤ 8 mg/l                   | 1208                     | 10                               | ≤ 16 mg/l                  |

**Tableau 11. Comparaison des seuils EUCAST et CA-SFM**

| Antibiotiques                                              | EUCAST                               |                | CA-SFM                                  |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------------------------------|
|                                                            | Cut-off épidémiologique <sup>1</sup> |                | Concentrations critiques R <sup>2</sup> |
|                                                            | <i>C. jejuni</i>                     | <i>C. coli</i> | <i>Campylobacter spp.</i>               |
| Macrolides (érythromycine, clarithromycine, azithromycine) | > 4 mg/l                             | > 16 mg/l      | > 4 mg/l                                |
| (Fluoro)quinolones                                         |                                      |                |                                         |
| ciprofloxacine                                             | > 1 mg/l                             | > 1 mg/l       | > 1 mg/l                                |
| acide nalidixique                                          | > 16 mg/l                            | > 32 mg/l      | > 16 mg/l                               |
| Tétracycline                                               | > 2 mg/l                             | > 2 mg/l       | > 8 mg/l                                |
| Aminoglycosides                                            |                                      |                |                                         |
| Streptomycine                                              | > 2mg/l                              | > 4 mg/l       | >16 mg/l                                |
| Gentamicine                                                | >16 mg/l                             | > 2 mg/l       | >4 mg/l                                 |
| Pénicillines                                               |                                      |                |                                         |
| Amoxicilline                                               | > 16 mg/l                            | > 8 mg/l.      | >16 mg/l                                |
| Ampicilline                                                | > 8 mg/l                             | > 16 mg/l      | >16 mg/l                                |

<sup>1</sup> Valeur seuil séparant la population sensible de la population résistante

<sup>2</sup> Valeur seuil séparant la population « intermédiaire » de la population résistante

Trois catégories ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : sensible (S), résistant (R) et intermédiaire (I).

- Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit, rédigé par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS).
- Les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
- Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

Les valeurs critiques du CA-SFM pour campylobacter sont indiquées dans le tableau 9.

Le besoin d'une harmonisation européenne dans la méthodologie des tests a conduit, en 2002, à la création de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Le Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie prend une part active à l'EUCAST et elle est l'un des six comités nationaux reconnus par l'EUCAST. L'EUCAST prend en compte les histogrammes de distribution des CMI de souches isolées dans les différents pays d'Europe, il ne s'agit plus de valeurs critiques définies par rapport à un probable succès ou échec thérapeutique, mais des cut-off épidémiologiques déterminés à partir des histogrammes de distribution des CMI. Les cut-off épidémiologiques proposés par l'EUCAST sont indiqués dans le tableau 10.

#### ➤ Comparaison des seuils CA-SFM et EUCAST (tableau 11)

Les seuils proposés par l'EUCAST sont différents pour *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*, les deux espèces sont regroupées avec les autres espèces de campylobacter dans les recommandations du CA-SFM.

Pour les fluoroquinolones et les macrolides qui sont les molécules de choix pour le traitement des entérites à campylobacter, les valeurs seuils retenues (valeurs critiques et seuils épidémiologiques) sont identiques pour *C. jejuni*.

#### 6.2.1.2 Méthodes génétiques

L'étude des mécanismes de la résistance aux antibiotiques, biochimique puis génétique, a permis l'identification de déterminants génétiques responsables des phénomènes de résistance observés.

Dans tous les cas, l'acquisition d'un mécanisme de résistance aux antibiotiques repose soit sur

- Un transfert horizontal de gènes (intégrons, transposons, plasmides)
- Une mutation d'un gène chromosomique ou plasmidique

La résistance aux antibiotiques est donc détectable avec les méthodes génétiques ; celles-ci détectent des gènes reconnus à l'origine d'un mécanisme de résistance. Cette détection se fait soit par hybridation, soit par amplification (PCR) et détection de l'amplicon obtenu (Cockerill 1999; Fluit, Visser et al. 2001; Sundsfjord, Simonsen et al. 2004).

Chez campylobacter, de nombreux mécanismes de résistance ont été identifiés ainsi que les gènes responsables. La détection de ces gènes permet l'étude de l'épidémiologie de la résistance chez campylobacter en apportant des connaissances soit sur l'accumulation (intégrons) soit sur la dissémination de ces gènes au sein des populations de campylobacter étudiées.

Les déterminants génétiques suivants de résistance aux antibiotiques sont décrits et peuvent être utilisés pour l'étude de la résistance aux antibiotiques chez campylobacter :

- Des intégrons porteurs de déterminants de résistance aux aminoglycosides (Gibreel and Skold 1998; Lee, Sanchez et al. 2002; O'Halloran, Lucey et al. 2004) .
  - Des plasmides porteurs de déterminants génétiques de résistance aux tétracyclines (Connell, Trieber et al. 2003)
  - Des mutations du gène de l'ADN gyrase associées aux résistances aux fluoroquinolones (Cooper, Segal et al. 2002)
  - Des gènes codant pour synthèse de pompes à efflux (Pumbwe and Piddock 2002; Corcoran, Quinn et al. 2005)
- Avantages des méthodes génétiques par rapport aux méthodes traditionnelles (Cockerill 1999; Sundsfjord, Simonsen et al. 2004)

La détection des gènes de résistance ne nécessite pas d'isoler le micro-organisme en culture pure. La possibilité de travailler directement sur les prélèvements (cliniques, animaux ou environnementaux) permet :

- Un gain de temps pour l'analyse, en particulier pour les campylobacters dont les conditions de croissance sont fastidieuses et lentes
- De détecter un mécanisme de résistance pour des micro-organismes qui ne sont pas cultivables avec les conditions de culture traditionnelles en laboratoire (par exemple sous forme viable non cultivable)
- De diminuer les risques pour le manipulateur qui n'est pas en présence d'une culture pure du micro-organisme

Les méthodes génétiques ne dépendent pas des conditions de culture des microorganismes. Elles permettent également la détection de mécanismes qui entraînent un faible niveau de résistance qui n'est pas toujours observable avec les méthodes phénotypiques. Enfin, elles fournissent une réponse claire : présence ou absence du déterminant génétique recherché. La lecture des résultats est facile et fiable et leur interprétation ne nécessite pas l'établissement de valeurs critiques qui peuvent varier d'un pays à l'autre.

➤ Inconvénients des méthodes génétiques

Les méthodes génétiques ne permettent de rechercher que les mécanismes de résistances qui sont déjà identifiés, la détection de l'émergence de nouveaux mécanismes n'est pas possible. « Avec les méthodes génétiques, on ne trouve strictement que ce que l'on cherche » (Cockerill 1999). De plus, tous les gènes impliqués dans la résistance ne sont pas connus.

Les techniques utilisées peuvent entraîner des résultats faussement négatifs :

- Une mutation sur le site de fixation des amorces peut empêcher l'amplification du gène cible

- Des inhibiteurs de la polymérisation peuvent être présents et empêcher la synthèse de l'amplicon
- La sensibilité des méthodes génétiques est liée au nombre de micro-organismes initialement présents.

De même, des faux positifs sont parfois observés :

- La présence d'un gène n'entraîne pas nécessairement son expression et les mutations sur les gènes de régulation ne sont pas détectées (sauf si l'amplification porte sur l'ARNm)
- La spécificité de la technique peut être altérée par la contamination de l'échantillon par des acides nucléiques ou des résidus des acides nucléiques précédemment traités.

Enfin, à la différence des méthodes traditionnelles pour lesquelles des standards sont publiés pour la préparation des milieux, les paramètres d'incubation des micro-organismes et l'interprétation des résultats obtenus, il n'y a pas de standard pour les méthodes génétiques.

➤ Intérêt complémentaire des méthodes génétiques par rapport aux méthodes phénotypiques

Les méthodes génétiques permettent de confirmer l'existence de mécanismes de résistance spécifique et d'un point de vue épidémiologique, d'analyser la dissémination de pathogènes spécifiques résistants ou de déterminants de résistance. En fonction des objectifs d'étude retenus, l'une ou l'autre de ces méthodes d'étude peut être choisie, mais elles restent complémentaires.

## 6.3 Mécanismes de résistance aux antibiotiques décrits chez campylobacter

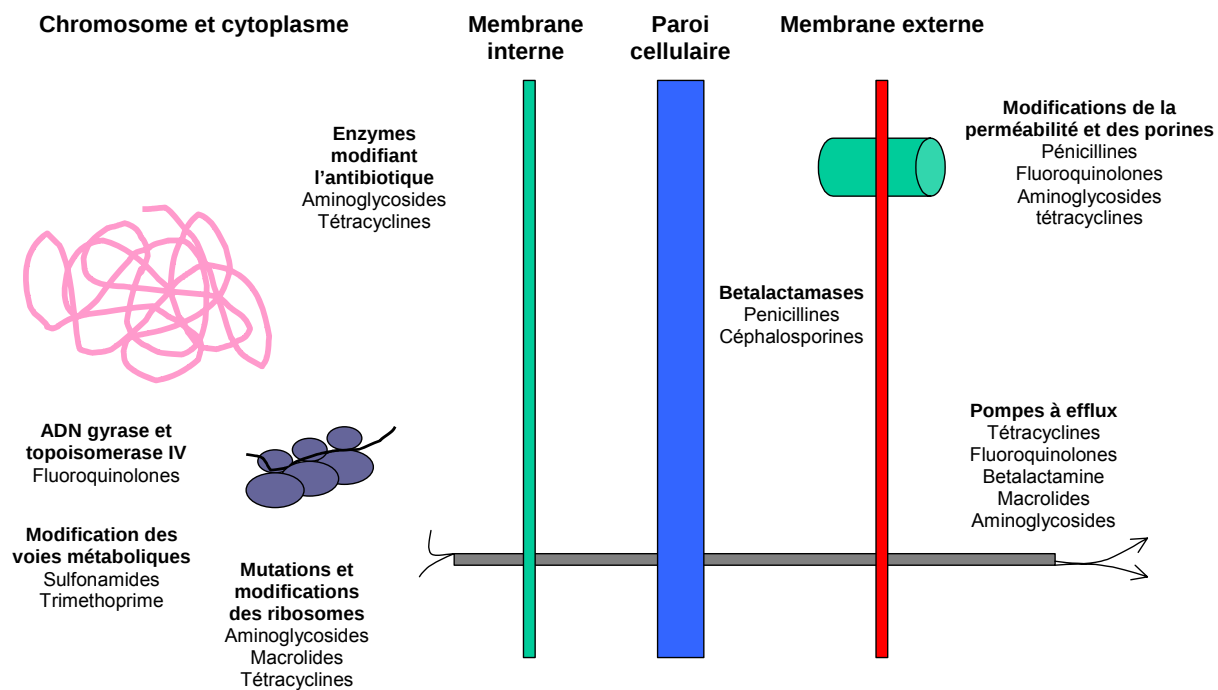
### 6.3.1 Résistances intrinsèques

Lors de résistance intrinsèque, toutes les souches d'une même espèce sont résistantes. Les campylobacters sont naturellement résistants aux antibiotiques suivants :

- Vancomycine
- Bacitracine
- Novobiocine
- Colimycine
- Streptogramine B
- Triméthoprine

*C. jejuni* et *C. coli* sont également résistants à la céphalotine et à la rifampicine. Ces antibiotiques sont utilisés dans divers milieux sélectifs d'isolement de ces bactéries. Ces résistances naturelles sont probablement imputables à l'incapacité de ces antibiotiques à traverser la membrane externe (Federighi 1999). Les mécanismes de résistance intrinsèque sont peu connus (Taylor and Courvalin 1988).

**Figure 8. Mécanismes de résistance aux antibiotiques d'après Sundsfjord, Simonsen et al. (2004)**



### 6.3.2 Résistances acquises

Les résistances acquises résultent de l'acquisition de nouveaux mécanismes par la bactérie qui la rendent résistante à l'antibiotique considéré. L'acquisition de ces mécanismes repose soit sur des mutations ponctuelles soit sur l'acquisition de matériel génétique exogène ( plasmides de conjugaison, transposons, intégrons). La résistance acquise aux antibiotiques chez campylobacter repose sur 3 mécanismes (figure 8):

- la synthèse d'enzymes dégradant les types de molécules d'antibiotiques,
- des modifications structurales des sites de liaisons de l'antibiotique dans la cellule bactérienne,
- une diminution de la perméabilité cellulaire, soit par une diminution de l'entrée des autres molécules d'antibiotiques, soit par une augmentation de leur efflux.

Très souvent, ces mécanismes de résistance sont combinés et modulent l'intensité de la résistance observée.

#### 6.3.2.1 Résistance aux bêta-lactamines

La membrane externe semble jouer un rôle important dans la résistance des campylobacter aux bêta-lactamines en tant que barrière imperméable. Environ 92% de *C. jejuni* et *C. coli* produisent des bêta-lactamases. La résistance semble être chromosomique (Federighi 1999).

#### 6.3.2.2 Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des formes chimiquement modifiées de l'acide nalidixique. Les cibles de ces antibiotiques sont deux enzymes bactériennes importantes lors de la réplication de l'ADN : l'ADN gyrase (type II isomérase) et l'ADN topoisomérase IV. L'inhibition de leur action conduit à l'arrêt de la croissance bactérienne. Les fluoroquinolones se complexent avec ces enzymes et empêchent la réplication de l'ADN. La résistance aux fluoroquinolones repose essentiellement sur une mutation de l'ADN codant pour la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase. Un seul point de mutation en Thr-86, Asp-90 ou Ala-70 peut entraîner une résistance. La mutation en Thr-86 est la plus commune et elle est associée à un niveau plus élevé de résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine que les deux autres mutations (Taylor and Tracz 2005). Une seule mutation entraîne un niveau de résistance élevé. Chez *C. jejuni*, l'efflux de la ciprofloxacine joue une part dans la résistance. L'opéron *cmeABC* code pour une pompe à efflux à large spectre qui contribue à la résistance intrinsèque de *C. jejuni* à de nombreux antibiotiques. En présence de ciprofloxacine, le blocage de la pompe CmeABC par un inhibiteur entraîne une accumulation intracellulaire de ciprofloxacine et augmente la sensibilité à différents agents anti-microbiens (Lin, Michel et al. 2002). Cependant, il semblerait que l'efflux ne joue qu'un rôle mineur dans la résistance aux fluoroquinolones (Payot, Cloeckert et al. 2002).

#### 6.3.2.3 Résistance aux macrolides : l'érythromycine

Chez *C. jejuni*, la résistance à l'érythromycine semble principalement liée à une modification du site cible du ribosome sur la région 23S de l'ARNr (Taylor and Tracz 2005).

**Tableau 12. Mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques chez *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli***

| Famille d'antibiotique | Mécanisme d'action                                                 | Mécanisme de résistance                                                                                                                                                | Support biochimique                                                                                                                                                                                          | Support génétique                                                                                                                                  | Références                                                                                                                                                                     |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| β-lactamines           | Inhibition de la synthèse du peptidoglycane bactérien              | Dégradation enzymatique                                                                                                                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• β-lactamases</li> <li>• diminution de la perméabilité membranaire</li> </ul>                                                                                        | Gène porté par le chromosome bactérien                                                                                                             | (Aarestrup and Engberg 2001)<br>(Avrain and Kempf 2000)<br>(Taylor and Courvalin 1988)<br>(Taylor and Tracz 2005)                                                              |
| Tétracycline           | Inhibition de la synthèse protéique par liaison aux ribosomes      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protection du site de fixation sur le ribosome</li> <li>• Efflux actif</li> <li>• (Dégradation de la tétracycline)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéine de protection du ribosome</li> <li>• pompe CmeABC</li> </ul>                                                                                               | Gènes portés par un plasmide <i>Tet(0)</i>                                                                                                         | (Taylor, Garner et al. 1983)<br>(Aarestrup and Engberg 2001)<br>(Pumbwe and Piddock 2002)                                                                                      |
| Macrolides             | Inhibition de la synthèse protéique par liaison aux ribosomes      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Modification du site de fixation sur le ribosome</li> <li>• Efflux actif</li> </ul>                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pompe CmeABC</li> </ul>                                                                                                                                             | Mutation sur le gène <i>23S ARNr</i>                                                                                                               | (Aarestrup and Engberg 2001; Engberg, Aarestrup et al. 2001; Pumbwe and Piddock 2002; Mamelli, Prouzet-Mauleon et al. 2005; Gibreel and Taylor 2006; Payot, Bolla et al. 2006) |
| Aminoglycosides        | Inhibition de la synthèse protéique par liaison aux ribosomes      | Dégradation enzymatique                                                                                                                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aminoglycosides phosphotransférases (APH)</li> <li>• Aminoglycosides adényltransférases (AAD ou ANT)</li> <li>• Aminoglycosides acétyltransférases (AAC)</li> </ul> | Gènes portés par <ul style="list-style-type: none"> <li>• le chromosome</li> <li>• un plasmide</li> <li>• un intégron sur le chromosome</li> </ul> | (Aarestrup 2005)<br>(Gibreel, Skold et al. 2004)<br>(Lee, Sanchez et al. 2002)<br>(O'Halloran, Lucey et al. 2004)                                                              |
| Fluoroquinolones       | Interaction avec le complexe ADN-ADN gyrase et la topoisomérase IV | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Modification du site de fixation sur l'ADN gyrase</li> <li>• Efflux actif</li> </ul>                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• CmeABC</li> </ul>                                                                                                                                                   | Mutation sur les gènes <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>gyrA</i>, <i>gyrB</i></li> <li>• <i>parC</i></li> </ul>                         | (Engberg, Aarestrup et al. 2001; Pumbwe and Piddock 2002; Payot, Bolla et al. 2006)                                                                                            |

#### 6.3.2.4 Résistance aux tétracyclines

La résistance aux tétracyclines est liée aux gènes *tet*, qui peuvent s'échanger entre genres bactériens et qui codent soit pour des protéines d'efflux soit pour une protection du ribosome. Chez *C. jejuni*, les gènes *tet(O)* et *tet(M)* ont été identifiés. Ils sont portés sur des plasmides et la résistance repose sur une protection du ribosome. La protéine *tet(O)* entraîne un changement de conformation du ribosome qui empêche la fixation de la tétracycline ce qui permet la poursuite de la synthèse des protéines (Taylor and Tracz 2005).

Les principaux mécanismes identifiés chez *Campylobacter* sont présentés dans le tableau 12.

### 6.4 Utilisation des antibiotiques chez la volaille

#### 6.4.1 Objectifs de l'utilisation des antibiotiques chez la volaille

Les antibiotiques peuvent être utilisés de 3 façons différentes chez l'animal avec des objectifs variables, à titre préventif curatif, en métaphylaxie et en prophylaxie (Schwarz and Chaslus-Dancla 2001; Schwarz, Kehrenberg et al. 2001).

A titre curatif, les antibiotiques sont administrés aux animaux malades, et l'objectif est d'obtenir la guérison des animaux, ainsi que d'éviter la contamination humaine dans le cas des maladies zoonotiques. Dans les élevages avec un grand effectif, la métaphylaxie consiste à traiter les animaux cliniquement malades et les autres animaux du groupe qui n'expriment pas (encore) de signes cliniques. En fonction des modes d'élevage des animaux de rente, l'administration d'antibiotiques peut-être nécessaire pendant certaines périodes critiques pour limiter l'apparition de maladies bactériennes, par exemple lors du tarissement des vaches laitières ou le sevrage des porcelets. Ce mode de traitement correspond à l'antibioprophylaxie.

L'usage d'antibiotiques en tant qu'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux est banni depuis 2006 dans l'Union européenne.

Le plus souvent, les volailles sont élevées dans des bâtiments confinés, par troupeaux de 10 000 à 20 000 animaux pour les poulets, et de 5 000 à 10 000 pour les dindes. Dans ces conditions, seul le traitement de masse est envisageable (métaphylaxie), les traitements sont administrés par voie orale dans l'eau de boisson ou dans un aliment médicamenteux.

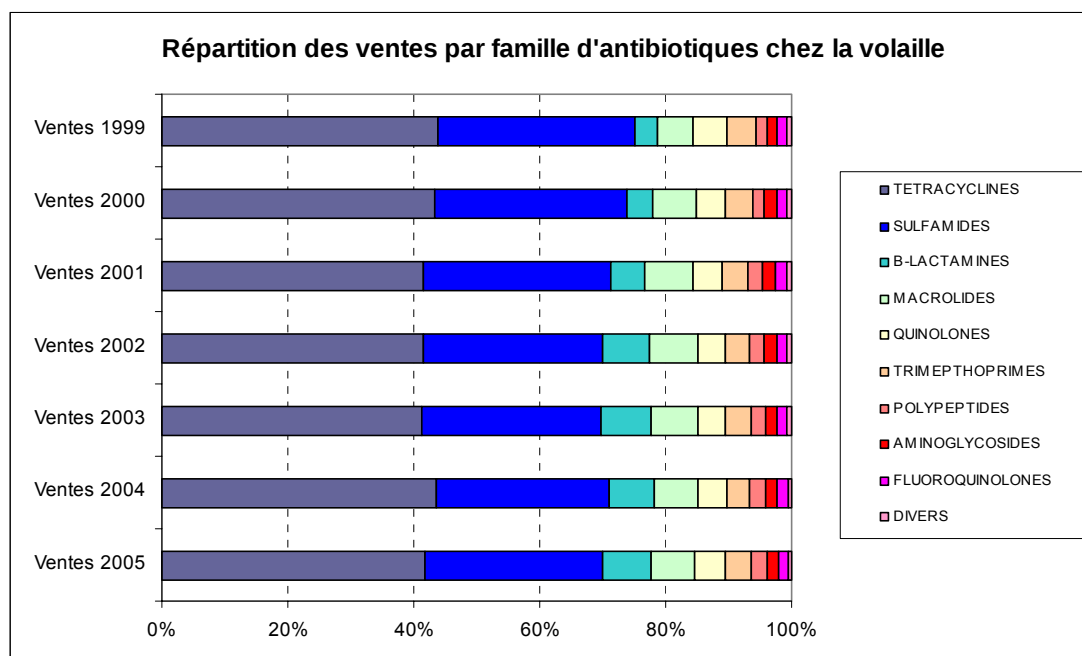
#### 6.4.2 Molécules antibiotiques utilisées en élevage de volailles

Les antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire appartiennent à différentes familles et sous-familles, communes à l'homme et à l'animal ; à l'exception de quelques sous-familles utilisées exclusivement en médecine humaine et d'une sous-famille propre à la médecine vétérinaire (sous-famille des pleuromutilines, macrolides apparentés) (Anonymous 2006). Aucun antibiotique appartenant aux céphalosporines ou aux phénicolés n'est autorisé pour les volailles. Les  $\beta$ -lactamines sont utilisées pour des usages généraux : infections pulmonaires, infections digestives. Les macrolides ont un spectre d'activité étroit, ils sont notamment indiqués dans les infections pulmonaires à Gram positif ainsi que les mycoplasmoses respiratoires fréquentes en élevage de volailles. Les sulfamides sont indiqués dans des usages généraux comme les infections pulmonaires, les

**Tableau 13. Evolution des ventes d'antibiotiques chez les volailles de 1999 à 2005 (Anonymous 2006)**

| <b>VOLAILLES</b> | <b>1999<br/>Tonnes</b> | <b>2000<br/>Tonnes</b> | <b>2001<br/>Tonnes</b> | <b>2002<br/>Tonnes</b> | <b>2003<br/>Tonnes</b> | <b>2004<br/>Tonnes</b> | <b>2005<br/>Tonnes</b> |
|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| AMINOGLYCOSIDES  | 1,83                   | 2,23                   | 2,12                   | 2,26                   | 1,77                   | 1,77                   | 1,62                   |
| B-LACTAMINES     | 4,06                   | 4,66                   | 5,56                   | 7,91                   | 7,63                   | 7,08                   | 7,31                   |
| CEPHALOSPORINES  | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   |
| DIVERS           | 0,80                   | 0,87                   | 0,78                   | 0,88                   | 0,65                   | 0,58                   | 0,45                   |
| FLUOROQUINOLONES | 1,71                   | 1,92                   | 1,80                   | 1,57                   | 1,64                   | 1,74                   | 1,58                   |
| FURANES          | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   |
| MACROLIDES       | 6,35                   | 8,16                   | 7,86                   | 8,26                   | 7,45                   | 6,89                   | 6,54                   |
| PHENICOLES       | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   | 0,00                   |
| POLYPEPTIDES     | 1,85                   | 2,11                   | 2,45                   | 2,46                   | 2,31                   | 2,43                   | 2,48                   |
| QUINOLONES       | 5,78                   | 5,40                   | 4,90                   | 4,46                   | 4,29                   | 4,50                   | 4,62                   |
| SULFAMIDES       | 34,44                  | 35,35                  | 30,92                  | 30,18                  | 27,93                  | 27,39                  | 27,22                  |
| TETRACYCLINES    | 48,12                  | 50,43                  | 43,34                  | 44,09                  | 40,60                  | 43,51                  | 40,01                  |
| TRIMETHOPRIMES   | 5,10                   | 4,94                   | 4,36                   | 4,10                   | 3,85                   | 3,82                   | 4,06                   |
| <b>TOTAL</b>     | <b>110,05</b>          | <b>116,07</b>          | <b>104,09</b>          | <b>106,17</b>          | <b>98,13</b>           | <b>99,72</b>           | <b>95,88</b>           |

**Figure 9. Répartition des ventes par famille d'antibiotiques chez la volaille (Anonymous 2006)**



colibacilloses. Les tétracyclines sont les plus employées pour le traitement d'infections respiratoires ou digestives. Les quinolones et fluoroquinolones sont indiquées dans les infections digestives et pulmonaires. En théorie, les éleveurs et le vétérinaire sont tenus de remplir une fiche sanitaire d'élevage pendant toute la durée de vie du troupeau. Sur cette fiche doivent être signalés les différents traitements administrés aux volailles.

#### 6.4.3 Quantité d'antibiotiques distribuée aux volailles

Chaque année, l'AFSSA et le ministère en charge de l'agriculture assurent un suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques, dont le rapport est consultable : <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/38901-38902.pdf> . Les données présentées ici sont issues du rapport de 2005. Selon les déclarations des industriels, 1320 tonnes de principes actifs d'antibiotiques à destination des animaux ont été vendues. Les tétracyclines représentent plus de la moitié des ventes totales, et les 4 familles tétracyclines, sulfamides,  $\beta$ -lactamines et les macrolides représentent plus de 80% du tonnage total d'antibiotiques vendus. En 2005, la part estimée des volailles par rapport au tonnage total d'antibiotique est de 7.27 %, soit de l'ordre de 96 tonnes. Le tableau 13 et la figure 9 présentent les quantités et les répartitions estimées par famille d'antibiotiques chez les volailles.

#### 6.4.4 Relation entre l'utilisation des antibiotiques et la résistance aux antibiotiques des campylobacters isolés chez la volaille

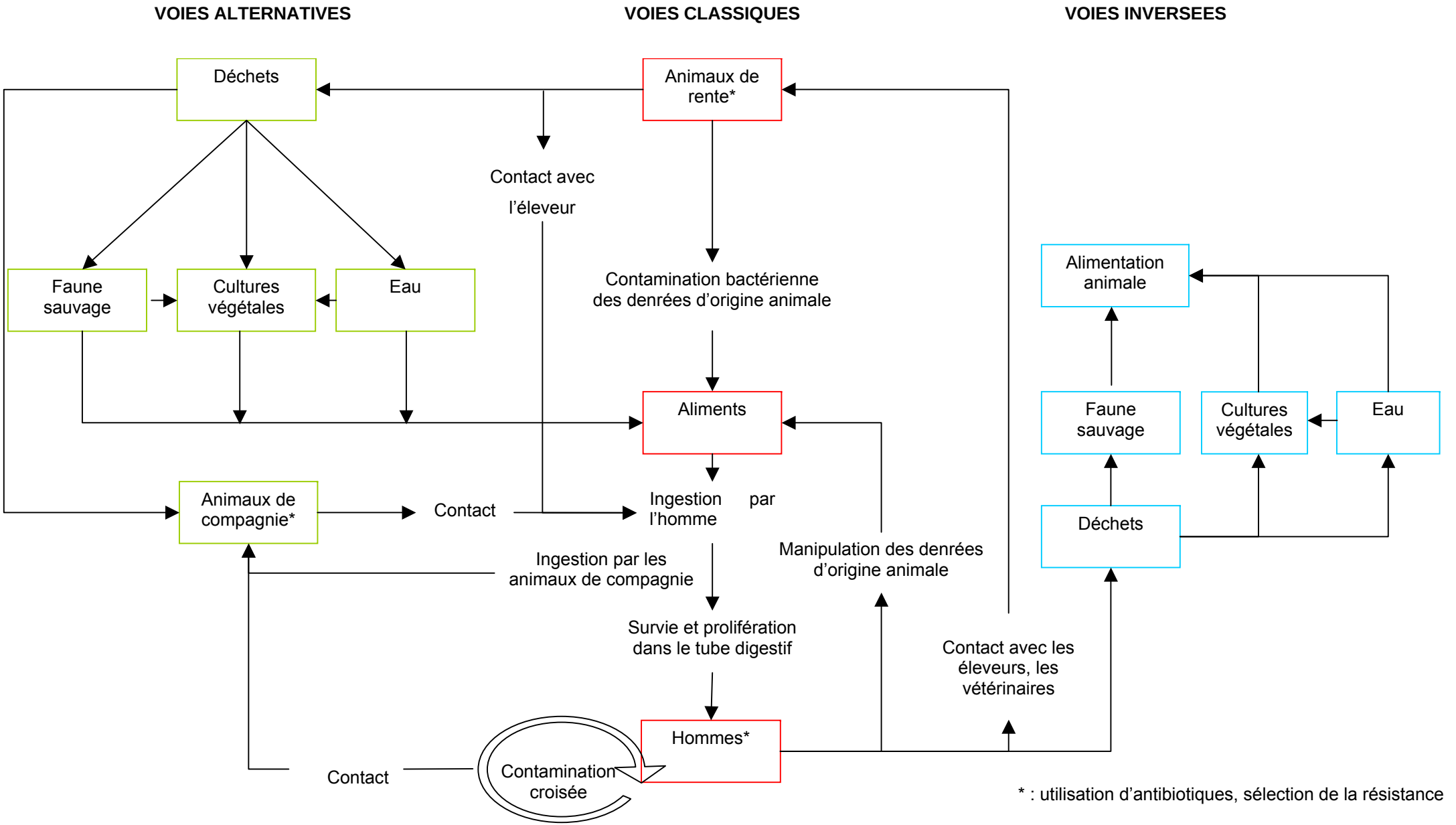
La relation entre l'usage des antibiotiques dans les élevages de volailles et la résistance aux antibiotiques chez les campylobacters isolés chez la volaille a été mise en évidence par trois types d'études (Anonymous 2006) :

- des études descriptives qui comparent l'évolution des taux de résistance des campylobacters à divers antibiotiques en fonction de leur mode d'utilisation dans la filière aviaire (études en conditions réelles)
- des études expérimentales avec la mise en œuvre d'essais cliniques,
- des études étiologiques par la réalisation d'essais cliniques sur le terrain en conditions réelles.

Certaines études ont montré que l'utilisation des antibiotiques chez la volaille sélectionne les souches de campylobacter résistantes à ces antibiotiques (Endtz, Ruijs et al. 1991; McDermott, Bodeis et al. 2002) (Gupta, Nelson et al. 2004). Cependant, la relation entre l'utilisation des antibiotiques et la résistance n'est pas toujours aussi simple, de nombreux facteurs influencent la sélection et la diffusion de l'antibiorésistance, et en particulier (Sanders 1999) :

- la population bactérienne concernée
  - la probabilité d'apparition d'une mutation dans cette population
  - l'influence de l'écosystème bactérien, les campylobacters commensaux dans le tube digestif des volailles ont une plus grande capacité à acquérir et échanger des plasmides porteurs de gènes de résistance
- les effets liés à la pharmacocinétique de l'antibiotique
- les effets liés aux traitements de la volaille : les doses utilisées et la durée du traitement, le nombre d'animaux traités, les pratiques d'élevage.

Figure 10. Voies de transmission des bactéries, pathogènes ou non, sensibles et résistantes aux antibiotiques entre les animaux et l'homme d'après Phillips, Casewell et al. (2004)



Ainsi, une étude (Lin, Yan et al. 2007) a mis en évidence que l'érythromycine utilisée à faible dose pendant une longue période (ce qui correspond à l'utilisation comme facteur de croissance) sélectionne les souches de campylobacter résistantes alors que la même molécule utilisée dans un but thérapeutique (et donc à une dose plus importante et pendant une courte période) ne sélectionne pas de souche résistante parce que le taux de mutation conduisant à la résistance à l'érythromycine est très faible chez campylobacter.

#### 6.4.5 Relations entre la résistance aux antibiotiques chez les souches d'origine aviaire et les souches isolées chez l'homme

Les antibiotiques sont utilisés chez l'animal pour prévenir ou traiter des infections bactériennes. Chez la volaille, la résistance aux antibiotiques des entéropathogènes zoonotiques (c'est à dire principalement les campylobacters et les salmonelles) est d'autant plus dangereuse en terme de santé humaine que ces bactéries peuvent être transmises à l'homme par le biais de la chaîne alimentaire (van den Bogaard and Stobberingh 2000; McEwen and Fedorka-Cray 2002; Swartz 2002).

Dès 1976, dans une étude portant sur des poulets ayant reçu de la tétracycline dans l'alimentation, il a été observé un transfert de gènes de résistance entre les souches d'*Escherichia coli*, entre les poulets et l'homme (Levy, FitzGerald et al. 1976). Pour campylobacter et les fluoroquinolones, une étude néerlandaise (Endtz, Ruijs et al. 1991) a démontré en 1991 que l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones d'isolats cliniques humains était reliée à l'utilisation de ces antibiotiques chez la volaille. L'utilisation des fluoroquinolones chez l'homme remonte aux années 80, ces molécules ont été introduites pour le traitement des infections de la volaille en 1987. Entre 82 et 85, aucune résistance aux fluoroquinolones n'a été mise en évidence chez des campylobacters d'origine humaine ou aviaire. Dans les années qui ont suivi l'introduction de ces molécules en élevage de volaille, les taux de résistance à la ciprofloxacine ont augmenté jusqu'à 11 et 14% respectivement chez l'homme et la volaille. Une étude aux Etats-Unis publiée en 2004 indique que les infections chez l'homme dues à des campylobacters résistants aux fluoroquinolones sont liées à la consommation de volailles colonisées par des souches résistantes plutôt qu'à la sélection de ces souches par le traitement antibiotique reçu par le patient (Iovine and Blaser 2004).

L'hypothèse du passage de la résistance aux antibiotiques des animaux à l'homme provient de l'observation de l'épidémiologie des zoonoses d'origine alimentaire, c'est à dire pour la volaille, les infections à campylobacters et à salmonelles. L'épidémiologie de ces maladies est loin d'être simple car il y a de nombreuses autres sources et voies de contamination de l'homme que les denrées d'origine animale (Phillips, Casewell et al. 2004). Les différentes voies de transmission sont présentées dans la figure 10. Bien que l'origine alimentaire des infections à campylobacter résistante aux antibiotiques ne soit pas exclusive, plusieurs études attestent de la réalité de ce mode de transmission (Anonymous 2006). Dans ce contexte, pour campylobacter, les souches antibiorésistantes importantes sont les souches résistantes aux macrolides et aux fluoroquinolones.

**Tableau 14. Résistance de *C. jejuni* et *C. coli* isolés chez l'homme et les volailles de chair de 1999 à 2004 d'après (Gallay, Prouzet-Mauléon et al. 2007)**

| Antimicrobial agent/year          | <i>C. jejuni</i> |                   | <i>C. coli</i>  |                   |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|                                   | Humans, no. (%)  | Broilers, no. (%) | Humans, no. (%) | Broilers, no. (%) |
| <b>Ampicillin</b>                 |                  |                   |                 |                   |
| 1999                              | 123 (42.3)       | 297 (22.6)        | 20 (70.0)       | 96 (29.2)         |
| 2000                              | 189 (40.2)       | 67 (31.3)         | 35 (37.1)       | 35 (31.4)         |
| 2001                              | 137 (47.4)       | 61 (13.1)         | 26 (53.8)       | 44 (25.0)         |
| 2002                              | 184 (45.6)       | 41 (29.3)         | 43 (48.8)       | 64 (28.1)         |
| 2003                              | 479 (46.1)       | 46 (34.8)         | 68 (28.1)       | 60 (30.0)         |
| 2004                              | 438 (38.1)       | 32 (28.1)         | 88 (14.9)       | 74 (24.3)         |
| <b>Erythromycin</b>               |                  |                   |                 |                   |
| 1999                              | 123 (0.8)        | 297 (0.3)         | 20 (10.0)       | 96 (31.3)         |
| 2000                              | 187 (3.2)        | 67 (3.0)          | 35 (8.6)        | 36 (11.1)         |
| 2001                              | 136 (3.7)        | 61 (4.9)          | 26 (7.7)        | 44 (4.5)          |
| 2002                              | 184 (2.7)        | 40 (5.0)          | 44 (9.0)        | 64 (17.2)         |
| 2003                              | 478 (0.6)        | 46 (4.3)          | 68 (7.3)        | 61 (31.1)         |
| 2004                              | 437 (1.4)        | 32 (0.0)          | 88 (12.5)       | 74 (17.6)         |
| <b>Tetracycline/doxycycline</b>   |                  |                   |                 |                   |
| 1999                              | 118 (23.7)       | 297 (56.6)        | 6 (25.0)        | 96 (69.8)         |
| 2000                              | 188 (12.8)       | 67 (55.2)         | 35 (14.3)       | 35 (60.0)         |
| 2001                              | 137 (9.5)        | 61 (65.6)         | 26 (26.9)       | 45 (80.0)         |
| 2002                              | 184 (22.8)       | 41 (67.5)         | 43 (41.8)       | 64 (84.4)         |
| 2003                              | 479 (26.7)       | 46 (60.9)         | 68 (63.2)       | 61 (96.7)         |
| 2004                              | 438 (28.8)       | 32 (40.6)         | 88 (53.4)       | 74 (71.6)         |
| <b>Ciprofloxacin/enrofloxacin</b> |                  |                   |                 |                   |
| 1999                              | †                | 297 (16.8)        | †               | 96 (39.6)         |
| 2000                              | 185 (23.8)       | 68 (23.5)         | 35 (31.4)       | 35 (28.6)         |
| 2001                              | 137 (21.9)       | 61 (29.5)         | 26 (34.6)       | 45 (37.8)         |
| 2002                              | 184 (31.7)       | 41 (31.7)         | 44 (43.2)       | 63 (41.3)         |
| 2003                              | 479 (25.9)       | 45 (13.3)         | 68 (38.2)       | 61 (41.0)         |
| 2004                              | 438 (25.3)       | 32 (9.4)          | 88 (42.0)       | 74 (32.4)         |

Les souches de volailles en 1999 et 2000 ont été testées vis à vis de l'enrofloxacin, puis à partir de 2001 vis à vis de la ciprofloxacin.

#### 6.4.6 Conséquences de la résistance aux antibiotiques des campylobacters sur les symptômes observés lors d'infection chez l'homme

Plusieurs études ont rapporté que les patients humains infectés par des souches de campylobacter résistantes aux fluoroquinolones présentaient une diarrhée prolongée, un risque plus élevé de maladie systémique et d'hospitalisation que les patients infectés par une souche sensible aux fluoroquinolones. (Engberg, Neimann et al. 2004; Iovine and Blaser 2004; Helms, Simonsen et al. 2005). Cependant, on ne sait pas si la sévérité des symptômes observés est liée à une augmentation de la virulence des souches résistantes aux fluoroquinolones ou à l'échec du traitement (Zhang, Sahin et al. 2006).

### 6.5 Plan de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez campylobacter

#### 6.5.1 Objectifs des plans de surveillance

Les objectifs des plans de surveillance sont triples :

- Etablir un état des lieux des niveaux de résistance de différents microorganismes d'intérêt et comparer des situations entre des régions ou entre des pays. Cette comparaison est rendue possible grâce à la standardisation des techniques mises en place et utilisées par les laboratoires participant à ces plans de surveillance.
- Evaluer l'efficacité de mesures qui ont pu être prises, comme par exemple l'arrêt des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'ensemble des pays de l'Union européenne.
- Suivre l'évolution de la résistance et éventuellement être capable de détecter des phénomènes de résistance émergents.

#### 6.5.2 Plan de surveillance français de campylobacter

##### 6.5.2.1 Chez la volaille (poulet de chair)

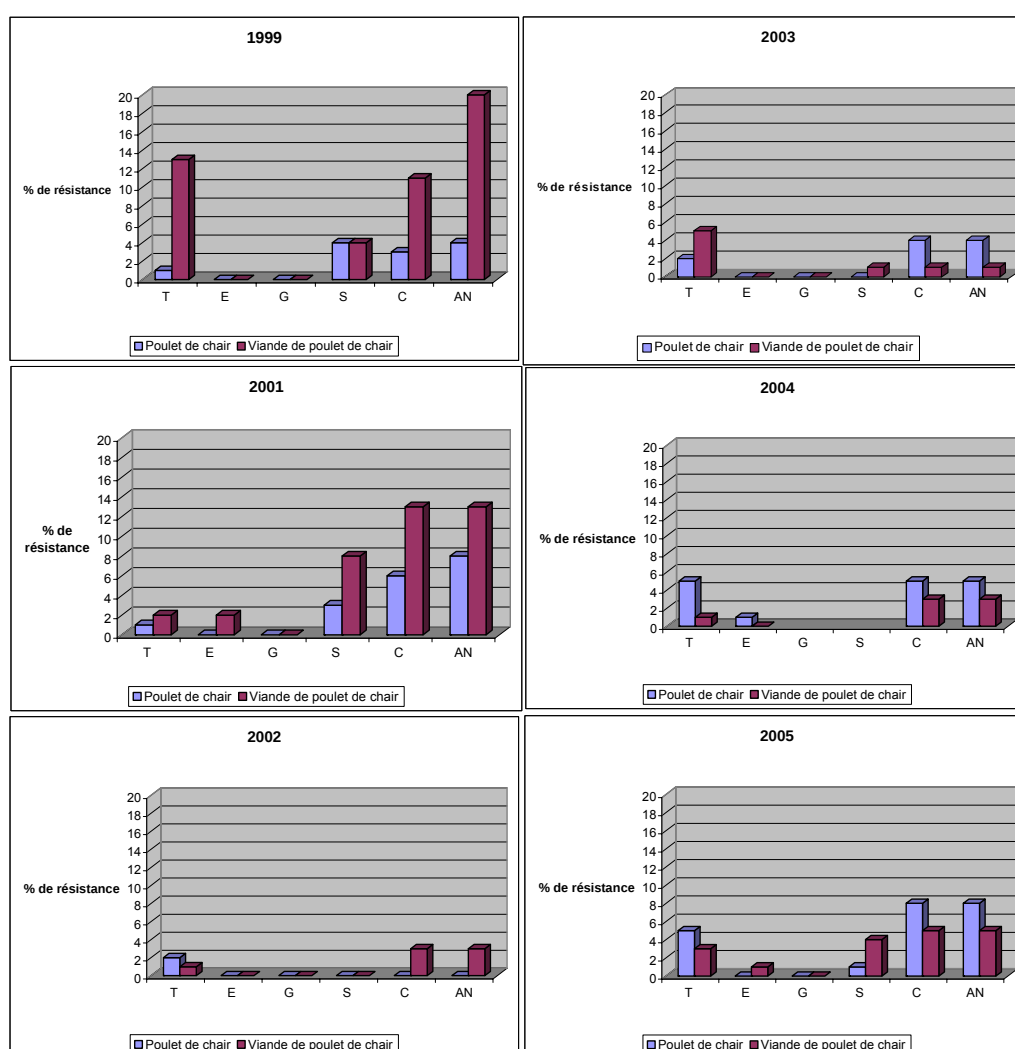
##### ➤ Pourcentages de résistance observés

La résistance aux antibiotiques des campylobacters d'origine aviaire et porcine est surveillée par un plan de surveillance annuel, mis en place par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) en 1999 pour les volailles et en 2000 pour les porcs (Anonymous 2006). Deux espèces de campylobacter sont surveillées : *C. jejuni* et *C. coli*. Les résistances aux antibiotiques qui font l'objet d'une surveillance sont celles vis à vis de l'ampicilline, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine, la tétracycline, l'érythromycine et la gentamicine. La détermination des CMI des souches de campylobacter testées pour le plan de surveillance est réalisée au laboratoire de l'AFSSA de Ploufragan. Les souches de campylobacter testées proviennent de prélèvements de caeca à l'abattoir à partir d'isolement direct. Le classement des souches se fait à partir des valeurs critiques fournies par le CA-SFM. En 2004 (Hellard and Kempf 2005), les souches de *C. coli* sont plus résistantes que les souches de *C. jejuni* (test du  $\chi^2$ ,  $p < 0.05$ ) pour l'acide nalidixique, la ciprofloxacine, la tétracycline et l'érythromycine. Une diminution de la résistance vis à vis de la ciprofloxacine est observée pour *C. jejuni* depuis 2001. Les *C. coli* montrent une forte diminution de la résistance à la tétracycline depuis 2003.

**Tableau 15. Fréquence de résistance de *C. jejuni* selon l'origine du prélèvement (animal à l'abattoir, viande provenant de commerce) prélevé chez la volaille (DANMAP 1999)**

| Antibiotique      | Pourcentage de <i>Campylobacter jejuni</i> résistants |        |
|-------------------|-------------------------------------------------------|--------|
|                   | Animal                                                | Viande |
| Tétracycline      | 1                                                     | 13     |
| Chloramphénicol   | 0                                                     | 0      |
| Érythromycine     | 1                                                     | 0      |
| Gentamicine       | 0                                                     | 0      |
| Ciprofloxacine    | 3                                                     | 11     |
| Acide Nalidixique | 4                                                     | 20     |
| Nombre d'isolats  | 69                                                    | 93     |

**Figure 11. Comparaison des pourcentages de résistance de *Campylobacter jejuni* dans les prélèvements de poulets de chair (caeca) et de viande de poulet de chair d'après (DANMAP 1999; DANMAP 2001; DANMAP 2002; DANMAP 2003; DANMAP 2004; DANMAP 2005)**



T : tétracycline, E : érythromycine, G : gentamicine, C : ciprofloxacine, AN : acide nalidixique

Pour les deux espèces de campylobacter, les pourcentages de résistance les plus élevés sont pour la tétracycline et aucune résistance n'est observée pour la gentamicine. Les taux de résistance observés chez les poulets de chair depuis 1999 sont indiqués dans le tableau 14.

➤ Comparaison des pourcentages de résistance observés entre les isolats de caeca et de peaux de cou (Hellard and Kempf 2005)

En 2004, 55 souches de *C. jejuni* avait été isolées à partir de prélèvements de peaux de cou. Une comparaison des pourcentages de résistance observés entre les 32 souches isolées des caeca et les 55 souches isolées soit directement soit après enrichissement des peaux de cou ne montre pas de différence significative.

#### 6.5.2.2 Chez l'homme

En France, les infections à campylobacter sont surveillées par un réseau de laboratoires qui envoient leurs isolats au centre national de référence pour *Campylobacter* et *Helicobacter* (CNRCH). La sensibilité des isolats de campylobacter est déterminée pour 7 antibiotiques : acide nalidixique, ciprofloxacine (depuis 2000), érythromycine, amoxicilline, gentamicine, tétracycline et doxycycline (depuis 2003). Les résultats des plans de surveillance des souches isolées chez l'homme sont présentés dans le tableau 14.

#### 6.5.3 Plans de surveillance européens

##### 6.5.3.1 Plan de surveillance de l'Union européenne

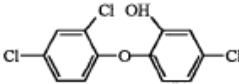
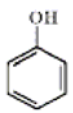
Actuellement, de nombreux états membres de l'Union européenne réalisent une surveillance de la résistance aux antibiotiques d'agents zoonotiques dont campylobacter. Selon la directive 2003/99/EC, les états membres doivent s'assurer que leur plan de surveillance fournit des données entre états membres comparables sur les pourcentages de résistance observés. En février 2007, un rapport de l'European food safety authority (EFSA) (Anonymous 2007) fournit un ensemble de précisions pour la réalisation de ces plans de surveillance nationaux : les antibiotiques retenus, les valeurs seuils à utiliser pour la classification des souches et les gammes de concentrations utilisées pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques de *C. jejuni* et *C. coli* isolés chez les poulets de chair. Les résultats obtenus permettront une surveillance de la résistance aux antibiotiques de campylobacter au niveau européen. Les antibiotiques testés pour campylobacter et les valeurs seuils retenus sont les valeurs proposées par l'EUCAST (voir tableau 10)

##### 6.5.3.2 Le plan de surveillance danois : DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial resistance Monitoring and Research Program)

Le plan de surveillance et le programme de recherche sur la résistance aux antibiotiques a été mis en place par les ministères danois en charge de l'agriculture et de la santé. Les objectifs de ce programme sont :

- de surveiller la prévalence de la résistance aux antibiotiques,
- de surveiller la consommation d'antibiotiques (chez l'homme et chez l'animal)

**Tableau 16. Structures chimiques et utilisation des substances actives entrant dans la composition des désinfectants utilisés en industrie agro-alimentaire d'après McDonnell and Russell (1999)**

|                        | Composé                  | Formule chimique                                                                                                                                                                                        | Utilisation  |
|------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Alcool                 | Éthanol                  | $\text{CH}_3 - \text{CHOH}$                                                                                                                                                                             | Désinfection |
|                        | Isopropanol              | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CHOH}$                                                                                                                                   | Conservation |
| Aldéhydes              | Glutaraldéhyde           | $\text{OH} - \text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C} - \text{HO}$                                                                                                                                    | Désinfection |
|                        | Formaldéhyde             | $\text{H} - \text{C} - \text{HO}$                                                                                                                                                                       | Conservation |
| Biphenols              | Triclosan                |                                                                                                                       | Conservation |
| Composés halogénés     | Composés chlorés         | $\phi\text{OCl}^-, \text{HOCl}, \text{Cl}_2$                                                                                                                                                            | Nettoyage    |
|                        | Composés iodés           | $\phi\text{I}_2$                                                                                                                                                                                        | Désinfection |
| Métaux lourds          | Composés argentiques     | Ag                                                                                                                                                                                                      | Désinfection |
|                        | Composés mercuriques     | Hg                                                                                                                                                                                                      | Conservation |
| Peroxydes              | Peroxyde d'hydrogène     | $\text{H}_2\text{O}_2$                                                                                                                                                                                  | Désinfection |
|                        | Ozone                    | $\text{O}_3$                                                                                                                                                                                            | Désinfection |
| Composés phénolés      | Acide peracétique        | $\text{CH}_3\text{COOOH}$                                                                                                                                                                               | Désinfection |
|                        | phénol                   |                                                                                                                     | Conservation |
| Ammoniums quaternaires | Structure générale       | $\left[ \begin{array}{c} \text{R}^1 \\ \text{N} \\ \text{R}^2 \end{array} \begin{array}{c} \text{R}^3 \\ \text{R}^4 \end{array} \right]^+ \text{X}^-$                                                   | Nettoyage    |
|                        | Chlorure de benzalkonium | $\left[ \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 \\ \text{N} \\ \text{R}_3\text{C} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{C}_{12}\text{H}_{25} \end{array} \right]^+ \text{Cl}^-$ | Désinfection |

- de réaliser des recherches sur l'association entre l'utilisation des antibiotiques chez les animaux et l'homme et la prévalence de la résistance observée chez les animaux, dans les denrées d'origine animale et chez l'homme

Le Danemark a été le premier pays à mettre en place ce type de surveillance, et les résultats obtenus permettent de suivre l'évolution de la résistance depuis 1995.

Le tableau 15 permet de comparer les fréquences de résistance observées chez les souches prélevées à l'abattoir (animal) et sur les denrées alimentaires durant l'année 1999 au Danemark. Les modalités de surveillance ne permettent pas de faire le lien entre les isolats obtenus à l'abattoir et ceux qui sont obtenus sur les denrées au niveau des commerces. On note toutefois des différences pour certains types de résistance chez *Campylobacter jejuni* (tétracycline, ciprofloxacine et acide nalidixique)

La figure 11 indique les histogrammes des pourcentages de résistance vis à vis des antibiotiques faisant l'objet d'un plan de surveillance de 1999 à 2004. Pour 2000, les données ne sont pas disponibles. A partir de 2001, la distinction est faite entre la viande de volaille produite au Danemark et celle qui est importée, et les chiffres rapportés dans cette figure ne prennent en compte que les résultats observés sur la viande de volaille produite au Danemark. De 1999 à 2002, les pourcentages de résistance observés dans la viande de volaille sont supérieurs à ceux observés sur les poulets de chair. Cette tendance s'inverse à partir de 2003.

## 7 Résistances bactériennes aux désinfectants

### 7.1 Définitions

#### ➤ Nettoyage et désinfection

En industrie agroalimentaire, le **nettoyage** correspond à l'enlèvement des souillures, des résidus d'aliments, de la saleté, de la graisse ou de toute autre matière indésirable. La **désinfection** est la réduction au moyen d'agents chimiques ou de méthodes physiques du nombre de microorganismes présents dans l'environnement jusqu'à l'obtention d'un niveau ne risquant pas de compromettre la sécurité ou la salubrité des aliments (AFNOR 1999).

#### ➤ Désinfectants

Un désinfectant est un produit chimique qui détruit les microorganismes. Il est destiné à être utilisé sur les objets inanimés ou les surfaces. De nombreuses familles chimiques et leurs composés sont regroupés sous le terme de désinfectant. Dans l'industrie agroalimentaire, l'utilisation des désinfectants vise à éliminer les flores pathogènes et d'altération qui pourraient nuire à la santé du consommateur ou aux qualités organoleptiques du produit. Les principales molécules désinfectantes utilisées en industrie agro-alimentaire sont indiquées dans le tableau 16.

### 7.2 Mécanismes d'action des désinfectants

#### 7.2.1 Mécanismes généraux

La compréhension des mécanismes d'action des désinfectants répond à plusieurs objectifs : tout d'abord, ils permettent la mise au point de solutions désinfectantes ayant une efficacité

Figure 12. Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes, d'après Cremieux, Freney et al. (1995).

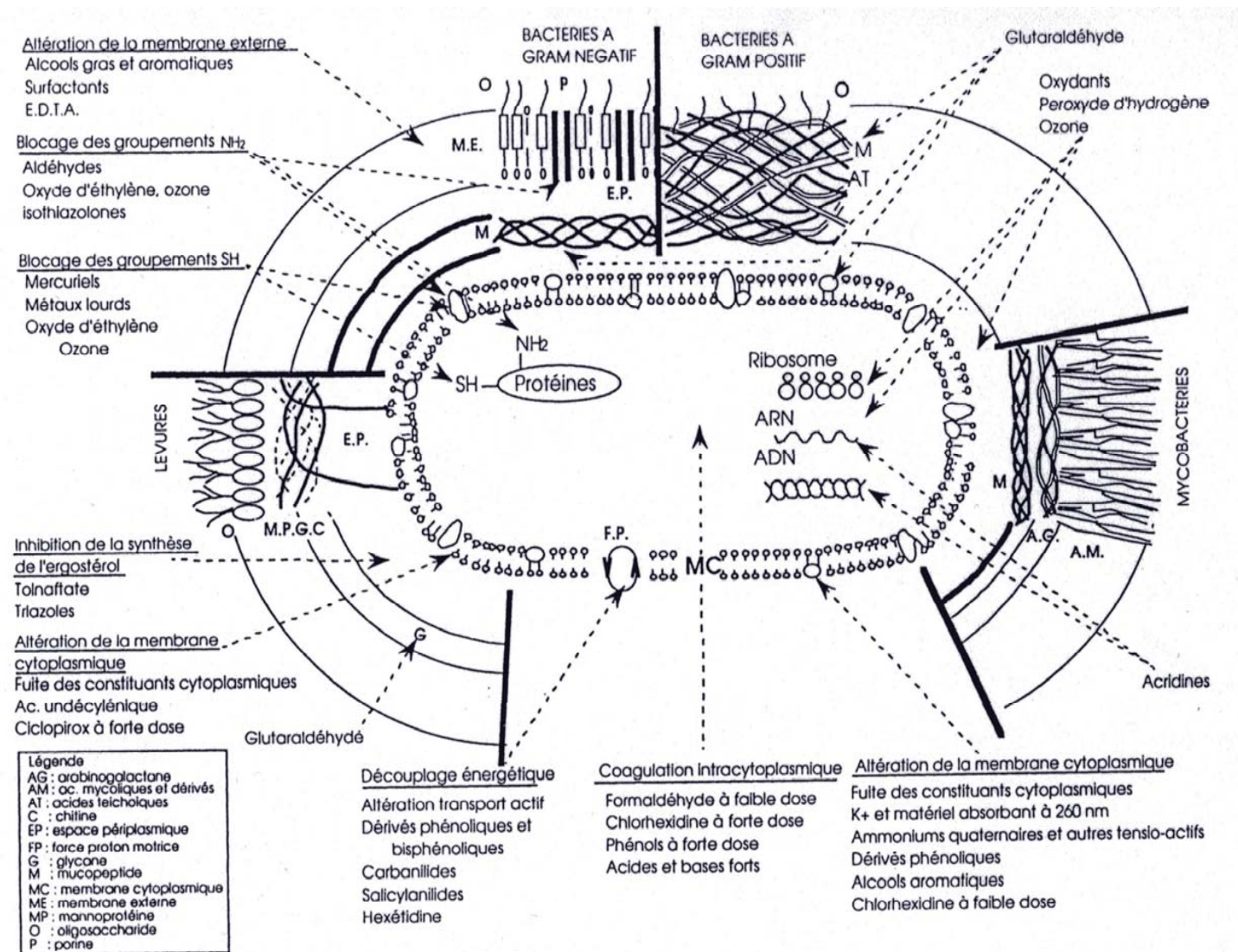


Figure 1 - Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes

antimicrobienne améliorée, ensuite, ils participent à la prévention de l'émergence de la résistance bactérienne (Denyer and Stewart 1998; Maillard 2002).

Parmi les désinfectants, on trouve d'une part des composés très réactifs, ayant une action brutale, rapide, temporaire et souvent non spécifique dont des oxydants comme les produits chlorés et d'autre part des composés chimiquement stables, ayant une action plus spécifique, parmi lesquels les composés d'ammoniums quaternaires.

Le mode d'action des désinfectants est plus ou moins bien compris selon les molécules. Fleurette et al. (Fleurette, Freney et al.) proposent un mode d'action en cinq étapes:

- 1/ adsorption à la surface de la cellule suivie de la pénétration dans la paroi (gram positif) ou membrane externe (gram négatif) ;
- 2/ réactions complexes avec la membrane cytoplasmique, qui est le site d'action primaire, conduisant à sa désorganisation;
- 3/ sortie des composants de faibles poids moléculaires du cytoplasme;
- 4/ dégradation des protéines et des acides nucléiques;
- 5/ lyse de la paroi causée par les enzymes autolytiques.

La figure 12 présente les sites d'actions des désinfectants en fonction des types de micro-organismes.

#### 7.2.2 Mécanisme d'action des ammoniums quaternaires

Les composés d'ammoniums quaternaires (QAC : quaternary ammonium compound) sont des tensio-actifs cationiques. Ce sont les désinfectants les plus utilisés en industrie agroalimentaire. Ils s'adsorbent facilement aux surfaces cellulaires. Le site d'action des QAC est la membrane plasmique. Très rapidement, suite à l'adsorption des molécules d'ammoniums quaternaires, la membrane plasmique se désorganise pour aboutir à une lyse et donc à la mort de la cellule bactérienne (McDonnell and Russell 1999).

#### 7.2.3 Mécanisme d'action des produits chlorés

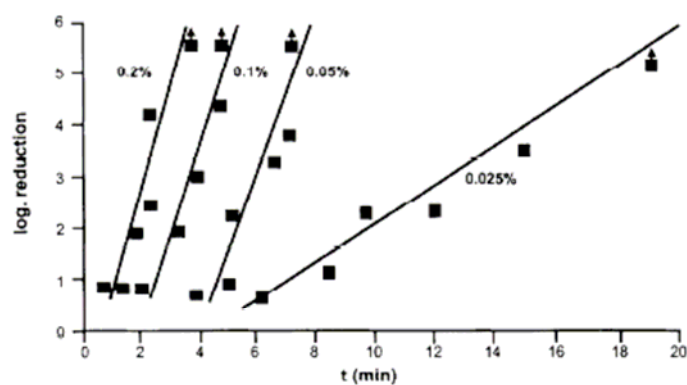
Leur mode d'action est encore mal compris. Ils agissent sur les diverses enzymes de la paroi et de la membrane cellulaire et au niveau du cytoplasme par oxydation des groupements thiols, ayant pour résultat une destruction des protéines et des acides nucléiques (McDonnell and Russell 1999; Beumer, Bloomfield et al. 2000).

### 7.3 Facteurs influençant l'efficacité des désinfectants

#### 7.3.1 Concentration et temps de contact

La figure 13 montre la relation entre le temps de contact avec le désinfectant et la réduction logarithmique sur le micro-organisme *Candida albicans*. Le désinfectant utilisé est un composé halogéné. Une augmentation de la concentration en désinfectant diminue le temps de contact nécessaire pour obtenir la même réduction logarithmique en microorganisme et réciproquement.

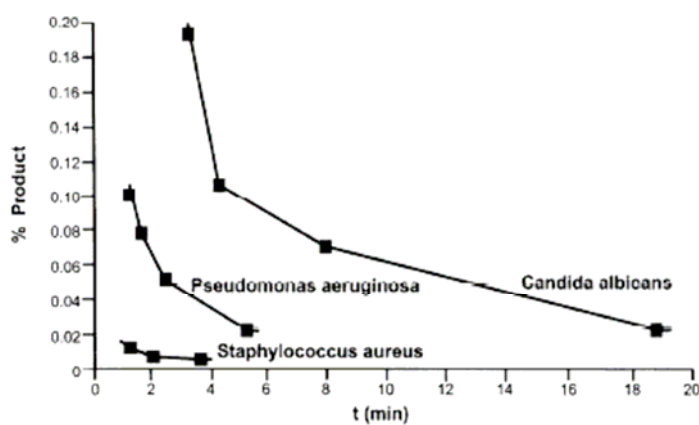
**Figure 13. Activité d'un composé halogéné sur *Candida albicans* d'après Bessems (1998)**



Méthode : Test en suspension CEN

Conditions du test : eau non dure et pas d'ajout de protéine (albumine sérique bovine)

**Figure 14. Activité d'un composé halogéné sur différents microorganismes d'après Bessems (1998)**



Méthode : Test en suspension CEN

Conditions du test : eau non dure et pas d'ajout de protéine (albumine sérique bovine)

### 7.3.2 Le type de microorganisme

Le même type d'expérience que celui présenté sur la figure 13 peut être reproduit pour différents types de microorganismes. Les résultats obtenus permettent de définir le spectre d'activité du désinfectant. Sur la figure 14, la relation temps-concentration nécessaire pour obtenir une réduction de 5 logarithmes est donnée pour *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. On peut voir sur cette figure que le composé halogéné a une faible activité sur *Candida albicans* : concentration élevée et temps long, et par contre qu'il tue *Staphylococcus aureus* à une concentration relativement faible et en un temps plus court.

Ces résultats indiquent que le type de micro-organisme visé est un paramètre très important dans le choix de la molécule désinfectante, sa concentration et le temps de contact.

### 7.3.3 Importance du nettoyage

Les molécules désinfectantes sont des composés chimiques qui réagissent avec les molécules organiques présentes dans le milieu dans lequel elles sont appliquées. Les désinfectants doivent donc être appliqués sur des surfaces nettoyées auparavant, c'est-à-dire débarrassées des résidus de matière organique.

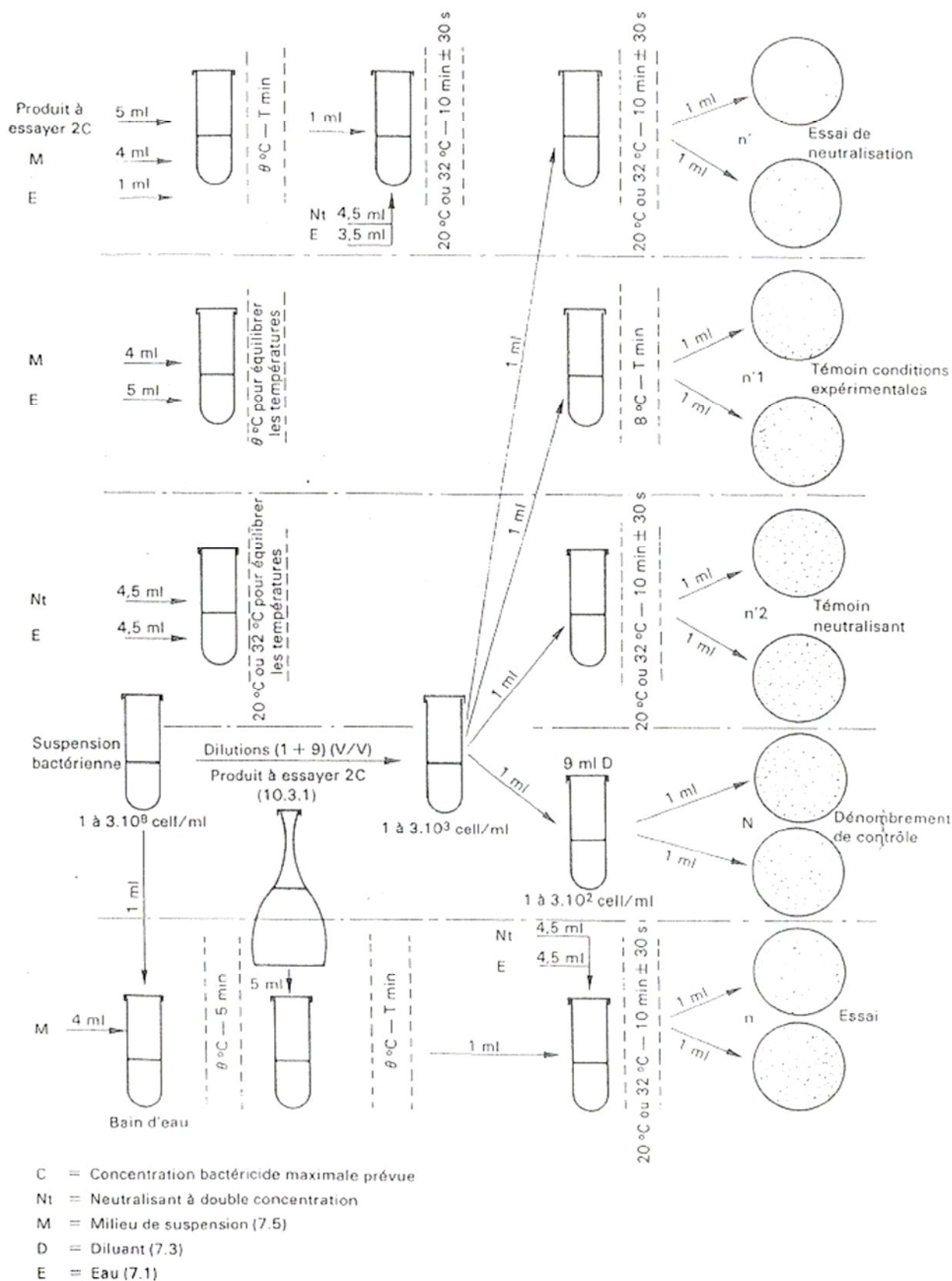
## 7.4 Définition de la résistance aux désinfectants

### 7.4.1 Résistance, sensibilité diminuée, moindre sensibilité

La terminologie et la méthodologie relatives à la résistance aux biocides dérivent des travaux réalisés sur les antibiotiques et on retrouve une tendance à extrapoler des antibiotiques aux désinfectants, sans considérer les différences fondamentales qui existent entre leur mécanisme d'action et les méthodes utilisées pour évaluer leur efficacité. Dans le contexte des antibiotiques, la résistance se réfère à la prévision du succès ou de l'échec thérapeutique. Dans le cas des désinfectants, il n'y a pas de situation clinique, il semble donc préférable d'utiliser les termes de « diminution de la sensibilité » ou de « sensibilité moindre ». Ce terme de « moindre sensibilité » est fréquemment retrouvé dans les études portant sur la sensibilité des bactéries aux désinfectants (McDonnell and Russell 1999; Beumer, Bloomfield et al. 2000; Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003).

Comme pour les antibiotiques, plusieurs définitions de la résistance aux désinfectants sont retrouvées dans la littérature, elles font référence à une population et à une méthode d'étude. Le seuil choisi est lié à la méthode d'étude. La résistance peut être définie comme la capacité temporaire ou permanente d'un microorganisme et de sa descendance à rester viables et/ou à se multiplier dans des conditions qui pourraient détruire ou inhiber d'autres souches de la même espèce (Cloete 2003). Cette définition est liée à la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI). D'autres auteurs (Gilbert and McBain 2003) définissent la résistance comme l'insensibilité relative d'un microorganisme à un désinfectant dans les conditions utilisées en pratique. Il s'agit alors d'une résistance « de terrain » qui peut être étudiée par rapport à la CMB nécessaire pour obtenir un effet visible sur la population bactérienne. Comme pour les antibiotiques, la définition que l'on donne de la résistance est liée à la technique d'étude choisie (CMI ou CMB) (Sidhu, Sorum et al. 2002).

Figure 15. Essai en suspension pour l'évaluation de l'efficacité bactéricide d'un produit selon la norme AFNOR NFT 72-300



#### 7.4.2 Pseudo-résistance, adaptation et tolérance

- La pseudo-résistance est une résistance qui est liée à une mauvaise utilisation en pratique du désinfectant, c'est à dire un non respect par l'utilisateur des conditions d'utilisation (spectre d'activité, concentration, température, temps de contact, pH, présence de matière organique). Une pseudo résistance peut également être liée à la nature de la surface à traiter : inaccessibilité ou nature du matériau qui ne permet pas le maintien du désinfectant à sa surface (Heinzel 1998).
- L'adaptation, le plus souvent, fait référence à une résistance qui est entraînée par les conditions du biotope. Ce phénomène peut être provoqué au laboratoire par des cultures successives des bactéries dans des milieux contenant des concentrations de plus en plus importantes de désinfectant. Le phénomène d'adaptation est en général réversible et disparaît quand le désinfectant n'est plus présent dans le milieu
- En raison du manque de standardisation de la définition de la résistance aux désinfectants, le terme de tolérance peut être utilisé à la place du terme de résistance (Anonymous 2007).

### 7.5 Méthodes d'études de la résistance aux désinfectants

Les méthodes d'évaluation des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (respectivement CMI et CMB) sont utilisées pour mettre en évidence des résistances aux désinfectants chez les bactéries (Wang, Powers et al. 1983; Bloomfield 2002; Trachoo and Frank 2002; Chapman 2003; Gilbert and McBain 2003).

#### 7.5.1 Mesure de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Dans le cadre de l'obtention des AMM (autorisation de mise sur le marché) pour les désinfectants utilisés en industrie agroalimentaire et en élevage (Loi du 22 décembre 1972) l'activité bactéricide du produit est appréciée par des essais, selon des normes standardisées AFNOR (Association française de normalisation ) ou CEN (Centre européen de normalisation). Le schéma opératoire d'une de ces normes est fourni en figure 15. Ce test d'efficacité détermine une concentration minimale bactéricide (CMB) qui est définie comme la plus faible concentration de désinfectant qui permet de réduire d'au moins  $10^5$  fois le nombre de bactéries, appartenant à des souches identifiées d'espèces microbiennes, mises en suspension dans un milieu liquide, et dans des conditions de temps et de température choisies et précisément définies (norme AFNOR NFT 72-300). La standardisation porte sur *l'inoculum* bactérien, la dureté de l'eau, les conditions de propreté ou de saleté (simulées par l'ajout d'albumine bovine dans la suspension) et le temps de contact.

En fonction de la méthode, au cours de l'essai, le désinfectant peut être inactivé soit par une méthode de filtration, soit par l'ajout d'un neutralisant dans la suspension contenant les bactéries. La dose d'emploi du produit appliquée sur le terrain doit être au moins égale, sinon supérieure à la valeur de la CMB déterminée selon ces normes d'études. La CMB est à relier à l'efficacité du désinfectant et cette efficacité est exprimée en réduction logarithmique de la population bactérienne étudiée pendant un temps de contact fixé (Bessemers 1998).

### 7.5.2 Mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'efficacité des antibiotiques est déterminée en mesurant leur CMI. La valeur obtenue a une signification concrète, puisqu'elle est peut être reliée aux concentrations plasmatiques et sériques du patient traité. L'action des antibiotiques est soutenue ou relayée par le système immunitaire du malade. Par contre, les désinfectants n'ont pas de système pour compléter leur action, ils ont en général des cibles cellulaires multiples, l'objectif étant d'obtenir une mort cellulaire rapide. Dans le cas des désinfectants, la mesure de la CMI est adaptée pour évaluer les phénomènes de moindre sensibilité, ayant lieu à des concentrations inférieures à la CMB. Cette situation peut se produire au cours de la désinfection dans les abattoirs si le désinfectant est sous-dosé ou dilué par l'eau de rinçage. En effet, ces phénomènes de moindre sensibilité peuvent être liés, entre autres, à la présence de pompes à efflux dont le fonctionnement est masqué aux concentrations utilisées pour la détermination de la CMB. La CMI correspond à la plus faible concentration de désinfectant qui ralentit ou inhibe la croissance bactérienne, après un temps de contact de 24 à 48 h (fonction des temps de croissance des bactéries). Les méthodes CMI utilisées sont les mêmes que celles qui sont employées pour les antibiotiques ; mais contrairement aux antibiotiques, les méthodes d'étude de la CMI pour les désinfectants ne sont pas standardisées.

### 7.5.3 Difficultés de l'étude de la résistance des bactéries aux désinfectants

#### 7.5.3.1 Facteurs influant sur l'efficacité des désinfectants

La mesure de l'efficacité d'un désinfectant repose sur la détermination de la CMB. Ce test est standardisé et il est difficile de standardiser au laboratoire les conditions d'application des désinfectants en pratique. L'extrapolation des résultats observés au laboratoire est donc délicate.

➤ Influence de l'*inoculum* bactérien :

- pour chaque essai, la concentration de départ en bactérie (mesurée en UFC/ml) est déterminée, afin de pouvoir effectivement calculer une réduction de 5 logarithmes. Cependant, les bactéries dans leur état naturel sont très rarement en suspension, et sont le plus souvent attachées aux surfaces. Des tests utilisant des petits coupons d'inox sur lesquels sont fixées des bactéries ont été décrits et les résultats montrent que l'efficacité des désinfectants est diminuée lorsque les cellules bactériennes sont fixées sur une surface (van Klingeren, Bloomfield et al. 1998). Par contre, à la suite d'un brossage (qui mime le nettoyage dans les conditions pratiques d'utilisation), les bactéries sont remises en suspension, et les taux de réduction sont plus élevés que ceux observés sur les bactéries fixées.
- Le stade physiologique des bactéries devrait également être pris en compte. La vision de l'activité des bactéries est biaisée par les cultures pures de clones uniques, qui ne sont pas représentatives de la situation des bactéries dans leurs biotopes naturels. Dans la nature, les populations bactériennes sont mixtes et chacune des sous-populations a une place définie (McDowell 2004).
- Pour les tests d'efficacité des désinfectants, les bactéries sont testées au moment de la phase stationnaire de leur croissance après culture dans un milieu « riche », or à l'état naturel, la plupart du temps, les bactéries sont dans des conditions qui ne sont pas favorables. Par

exemple, dans les abattoirs de volailles, les bactéries sont soumises à de nombreux stress (thermiques, chimiques, osmotiques) et leur état ne correspond pas à l'état des bactéries en fin de phase exponentielle ou au début de phase stationnaire. Il a été démontré que des modifications des conditions de croissance des bactéries ou de leur stade de croissance avaient un impact sur leur résistance (Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003).

➤ Standardisation des paramètres des essais d'efficacité

- Les tests d'efficacité des désinfectants sont réalisés au laboratoire à température constante de 20°C. Cette température est beaucoup plus élevée que celle observée dans les abattoirs de volailles. Dans les zones d'abattage, la température est en général inférieure à 20°C et dans les zones de découpes, la température est maintenue à 4°C.
- Les conditions de propreté sont mimées par l'ajout d'albumine sérique bovine. En conditions de « propreté », la concentration finale en albumine bovine est de 0,3 g/l, en conditions de « saleté », la concentration finale est de 3 g/l. Ces deux standardisations permettent d'évaluer la perte d'efficacité du désinfectant dans des conditions qui se rapprochent de celles observées sur le terrain, car le nettoyage réalisé en IAA ne permet pas d'éliminer tous les résidus de matière organique.
- Le type de neutralisant et le mode de neutralisation ont également une influence sur l'efficacité mesurée du désinfectant (Langsrud and Sundheim 1998).
- Enfin, les mesures d'efficacité ne sont réalisées que sur des souches de collection, des souches « types », or il est démontré que pour certaines espèces bactériennes, la sensibilité observée (mesurée par la CMI ou la CMB) peut varier d'une souche à l'autre (d'un facteur 5 à 50) (Heinzel 1998; Langsrud and Sundheim 1998).

#### 7.5.3.2 Influence des désinfectants sur les milieux de culture et la croissance bactérienne

- Les molécules désinfectantes interagissent avec les molécules organiques. Dans le cas des essais de mesure de CMI où le désinfectant est mélangé au milieu de culture (liquide ou gélosé), la quantité de désinfectant encore efficace après le mélange n'est pas connue. En interagissant avec les molécules organiques, le désinfectant modifie le pH et la nature des composés présents dans le milieu. Le milieu de culture n'est donc plus favorable à la croissance bactérienne et on ne sait pas alors si l'absence de croissance correspond à une inhibition liée à la présence du désinfectant ou à une absence des conditions nécessaires (Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003).
- Le milieu de croissance utilisé pour les mesures de CMI peut également avoir une influence sur la sensibilité observée des souches au désinfectant. Une étude a démontré que lors de tests réalisés en suspension, les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* étaient significativement plus sensibles aux désinfectants testés que les mêmes bactéries cultivées en milieu gélosé (Brill, Goroncy-Bermes et al. 2006).

## 7.6 Mécanismes de résistance bactérienne aux désinfectants

Les bactéries résistantes peuvent être sélectionnées lorsqu'elles sont mises en contact avec des concentrations sublétales de produits désinfectants. La fréquence de cette situation est probablement

sous-estimée car dans les conditions pratiques, les bactéries peuvent être au sein de biofilms, le désinfectant peut être partiellement inactivé par des substances présentes dans le milieu (persistance de matières organiques suite à un nettoyage imparfait), ou des conditions d'utilisation du désinfectant non respectées (pH, température, temps de contact). Un rinçage insuffisant des surfaces traitées peut également entraîner la présence de désinfectant à des concentrations sublétales et entraîner une exposition des bactéries présentes dans le milieu extérieur à ces concentrations.

#### 7.6.1 Résistance intrinsèque des différents groupes bactériens

La résistance des micro-organismes aux désinfectants est dite intrinsèque lorsque toutes les souches de l'espèce considérée sont résistantes au désinfectant testé. Ces observations conditionnent le spectre d'activité du désinfectant. Parmi les bactéries, les bactéries à coloration de Gram négative sont en général relativement moins sensibles que les bactéries à coloration de Gram positive parce que la paroi bactérienne (membrane externe) joue un rôle de barrière qui limite l'entrée dans la cellule de nombreux agents antimicrobiens (Sidhu, Sorum et al. 2002).

#### 7.6.2 Mécanismes de résistance acquise aux désinfectants

##### 7.6.2.1 Généralités sur les mécanismes de résistance acquise

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les conditions environnementales sont très importantes pour l'efficacité des désinfectants et en particulier l'état physiologique des bactéries (c'est à dire leur stade de croissance), leur interaction avec les surfaces, leur présence au sein d'un biofilm, la production de mucus, la présence de matière organique ou d'autres micro-organismes. En fonction de ces conditions, les bactéries sont capables de survivre à la désinfection dans les environnements agroalimentaires même si leur CMI mesurée au laboratoire est plus faible que la concentration d'utilisation du désinfectant (Sidhu, Sorum et al. 2002).

Une résistance bactérienne aux désinfectants a été rapportée pour les composés iodés, les ammoniums quaternaires, les peroxydes, les composés phénols, les composés chlorés et le glutaraldéhyde. Les conséquences de cette résistance sont sanitaires (santé humaine et santé animale) et économiques.

Les substances antibactériennes sont très nombreuses, mais elles ont un nombre limité de mode d'action et les bactéries n'ont finalement développé qu'un nombre limité de stratégies pour résister. La résistance peut résulter d'une mutation, de l'acquisition de nouveaux gènes par un transfert horizontal, de l'expression de gènes auparavant silencieux. Les stratégies disponibles pour les cellules isolées sont (Heinzel 1998; McDonnell and Russell 1999; Sidhu, Sorum et al. 2002; Chapman 2003) :

- Des modifications des sites d'action, cibles des désinfectants dans la cellule bactérienne
- L'inactivation des molécules désinfectantes par un inhibiteur (le plus souvent des enzymes comme les peroxydases)
- La réduction de la concentration intracellulaire de la molécule désinfectante soit en diminuant la perméabilité de la membrane soit en augmentant les mécanismes d'efflux.

**Tableau 17. Occurrences sur Pubmed des références portant sur différents genres bactériens et les mots-clé « désinfectant » ou « biocide »**

| Mot-clé                 | <i>Salmonella</i> | <i>Listeria</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas</i> | <i>Campylobacter</i> |
|-------------------------|-------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| Disinfectant            | 509               | 122             | 1448                    | 1264               | <b>28</b>            |
| Biocide                 | 486               | 120             | 1407                    | 1220               | <b>26</b>            |
| Disinfectant or Biocide | 522               | 124             | 1480                    | 1278               | <b>29</b>            |

#### 7.6.2.2 Mécanismes de résistance aux composés d'ammoniums quaternaires

La résistance aux ammoniums quaternaires est la résistance qui a été la plus étudiée. Deux mécanismes ont été identifiés : des pompes à efflux et des modifications de la membrane plasmique.

##### ➤ Les pompes à efflux

La majorité des souches résistantes aux composés d'ammoniums quaternaires (résistance mesurée par rapport à leur CMI) présentent une ou plusieurs pompes à efflux (Heir, Sundheim et al. 1995; Sudheim, Langsrud et al. 1998; Heir, Sundheim et al. 1999; Heir, Sundheim et al. 1999). Ces pompes sont situées dans la membrane plasmique, fonctionnent avec l'énergie proto-motrice et appartiennent soit à la grande famille des protéines de transport soit à la famille des protéines de multirésistance (mdr). Un grand nombre de gènes codant pour ces pompes a été identifié à la fois chez des bactéries à gram positif (*qacA*, *qacB*, *smr*, *qacG*, *qacH*) et à gram négatif (*emrE*, *qacE* et *qacEΔ1*) (Chapman 2003). Toutes ces pompes sont capables d'excréter activement les ammoniums quaternaires, ce qui conduit à une résistance plus ou moins élevée en fonction du type de pompe et de l'espèce bactérienne. Les gènes *qacE* et *qacEΔ1* ont été détectés sur des intégrons de bactéries à gram négatif. Ces éléments génétiques mobiles sont susceptibles d'être échangés entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes.

##### ➤ Modifications de la membrane plasmique

Un mécanisme de résistance partiel a également été démontré chez une souche de *Pseudomonas aeruginosa* adaptée aux ammoniums quaternaires par culture par passages répétés dans des milieux contenant des concentrations croissantes d'ammoniums quaternaires. Ce mécanisme repose sur une modification de la composition de la membrane plasmique montrant une diminution du taux d'acide palmitique et une augmentation des acides gras hydroxylés ainsi que de l'acide laurique. Cependant, dans ce cas, la sensibilité des souches est rapidement restaurée en l'absence d'ammonium quaternaire.

#### 7.6.2.3 Résistance aux désinfectants des bactéries dans les biofilms

Les populations bactériennes peuvent s'organiser sous la forme d'un biofilm. Cette structure induit une diminution de l'accès du désinfectant aux bactéries par différents moyens (Chapman 2003) :

- Les molécules de désinfectant réagissent avec les composés extracellulaires du biofilm (glycocalix)
- La structure du biofilm diminue la cinétique de diffusion au sein du biofilm

De plus, le gradient de nutriments et de toxiques diffusant au sein du biofilm entraîne des altérations phénotypiques, qui conduisent à l'observation au sein de la population du biofilm de phénotypes sensibles à résistants. Dans les biofilms, des bactéries présentant un phénotype résistant au sein des populations bactériennes sensibles sont nommées « persister » (Lewis 2005).

### 7.7 Résistance de campylobacter aux désinfectants

La résistance de campylobacter aux désinfectants a fait l'objet de très peu d'études comparativement aux autres bactéries isolées des denrées d'origine animale, pathogènes ou non pour l'homme. Le

tableau 17 indique le nombre de références trouvées sur Pubmed pour cette bactérie avec les mots clés « désinfectant » et/ou « biocide ». Le résultat est édifiant avec moins de 30 références pour campylobacter, alors qu'on en compte près de 1500 pour *Escherichia coli*.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet apparent « manque d'intérêt » de la communauté scientifique pour ce sujet. Les campylobacters sont des bactéries fastidieuses à cultiver au laboratoire, l'étude de la sensibilité des souches aux désinfectants est également difficile à réaliser, les méthodes d'étude des désinfectants sont peu nombreuses, parfois compliquées à mettre en oeuvre et les résultats difficiles à interpréter. En conséquence, les études de sensibilité ou de résistance aux désinfectants s'intéressent en premier lieu à des bactéries dont la culture est aisée.

De plus, les quelques études réalisées sur campylobacter semblent montrer une grande sensibilité aux désinfectants (Wang, Powers et al. 1983; Blaser, Smith et al. 1986; Trachoo and Frank 2002; Avrain, Allain et al. 2003) et la recherche de ce germe dans les industries agro-alimentaires après nettoyage et désinfection s'est toujours, jusqu'à récemment (Johnsen, Kruse et al. 2007), révélé infructueuse (Miwa, Takegahara et al. 2003; Borck and Pedersen 2005; Cools, Uyttendaele et al. 2005; Malakauskas, Jorgensen et al. 2006). Les conclusions de ces études conduisent à penser que les campylobacters sont globalement sensibles à l'action des désinfectants utilisés en industrie agroalimentaire.

## **8 Facteurs de modulation de la résistance aux antibiotiques**

Il est évident que les antibiotiques et leur utilisation sont le pivot central de la sélection de la résistance bactérienne, mais la dissémination des gènes et des bactéries résistantes contribue au problème. La sélection de bactéries résistantes peut se produire pendant ou après un traitement antimicrobien, des résidus d'antibiotiques peuvent être retrouvés pendant de longues périodes après l'arrêt du traitement. En dehors des antibiotiques, il y a une quantité d'autres produits utilisés dans le but de détruire les bactéries et en particulier les biocides et les désinfectants ; ce qui conduit à reconsidérer notre perception de l'écologie microbienne, non seulement en terme de bactéries résistantes versus sensibles, mais également en terme de types de bactéries qui sont capables de survivre à ces traitements (Levy 2002; McDowell 2004).

### **8.1 Origine des gènes de résistance aux antibiotiques**

Les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques sont probablement apparus chez les organismes producteurs d'antibiotiques, chez lesquels ils jouent un rôle protecteur (Baquero, Negri et al. 1998; Alonso, Sanchez et al. 2001). De temps en temps, ces gènes ont été transférés aux bactéries voisines qui sont devenues résistantes. Par exemple, les gènes *otrA* et *otrB* confèrent la résistance à la tétracycline. Ils sont présents chez les mycobactéries mais également chez *Streptomyces rimosus*, qui est un champignon producteur de tétracyclines.

Cependant, tous les gènes de résistance aux antibiotiques n'ont pas été retrouvés chez les micro-organismes producteurs d'antibiotiques. Ceci est peut-être lié au fait qu'on estime que moins de 1% des espèces environnementales ont été isolées, et que par conséquent, les microorganismes porteurs de ces gènes n'ont pas encore été isolés. Néanmoins, il est possible que certains gènes de résistance

aux antibiotiques aient un rôle physiologique initial différent de la seule résistance aux antibiotiques et une autre hypothèse est alors que les bactéries voisines des organismes producteurs d'antibiotiques avaient, au cours de mutations aléatoires, modifié des gènes dont le rôle initial a été détourné pour des fonctions d'élimination ou de détoxification des antibiotiques (Baquero, Negri et al. 1998; Alonso, Sanchez et al. 2001 ). Dans le cas des bactéries non productrices d'antibiotiques, si tous les isolats d'une espèce bactérienne portent le (ou les ) même(s) gène(s) de résistance aux antibiotiques, on peut supposer que ces déterminants génétiques ont un rôle différent de la résistance aux antibiotiques, parce que les espèces non productrices d'antibiotiques ne sont pas en permanence sous la pression de sélection des antibiotiques dans l'environnement.

Par exemple, les  $\beta$ -lactamases codées par le gène *AmpC* entraînent une résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries. Ce gène est présent dans toutes les espèces du genre, ce qui laisse supposer qu'il a été acquis avant la différenciation en espèce, des centaines de milliers d'années avant la découverte des antibiotiques. Il semblerait que les  $\beta$ -lactamases auraient pour origine des transpeptidases impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire. Bien que leur rôle n'ait pas été démontré, les  $\beta$ -lactamases pourraient être impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane ou être des molécules ancestrales sans rôle clair dans le métabolisme bactérien. Quoiqu'il en soit, certains auteurs pensent que les gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases sont des gènes de ménage et que leur activité antimicrobienne est un à-côté de leur véritable activité physiologique (méconnue) (Alonso, Sanchez et al. 2001).

Certaines pompes à efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques semblent jouer un rôle dans les phénomènes de quorum sensing. *Pseudomonas aeruginosa* synthétise une quinolone naturelle qui participe au quorum sensing et le système d'efflux MexABOprM est capable d'excréter cette molécule. Il a été démontré que des souches de *P. aeruginosa* isolées dans l'environnement avant l'utilisation des quinolones (qui sont des antibiotiques de synthèse) sont capables d'excréter cette molécule. Il est possible que leur action d'efflux des quinolones soit un à-côté du rôle physiologique de cette pompe qui est en fait l'excrétion de cette molécule de quorum sensing. Ainsi, il est possible que les mutants qui portent ce déterminant génétique en grande quantité soient sélectionnés et renforcent le rôle de ces pompes comme déterminants de la résistance.

Ces différents gènes peuvent parfois être transmis à d'autres bactéries (pathogènes ou non). Une fois que ces gènes sont présents dans des bactéries hétérologues, ils ne sont plus sélectionnés pour leur rôle physiologique primaire et leur rôle se limite à l'antibiorésistance.

Ainsi, les gènes de résistance aux antibiotiques ont une origine environnementale, parfois comme mécanisme de résistance aux antibiotiques et parfois avec une fonction différente. L'environnement joue donc probablement un rôle dans la sélection de ces gènes, et la résistance aux antibiotiques n'est pas toujours la conséquence d'une pression de sélection par les antibiotiques (Alonso, Sanchez et al. 2001).

## 8.2 Facteurs environnementaux

Depuis des millénaires, les bactéries ont été continuellement confrontées à des composés organiques ou minéraux qui affectent leur croissance. Pour survivre, les bactéries ont acquis des gènes de résistance.

Les conditions environnementales des bactéries vont définir la pression de sélection. La pression de sélection est un concept global qui comprend les différents facteurs composant un environnement. Ces facteurs vont permettre aux organismes présentant une nouvelle mutation ou de nouvelles caractéristiques acquises de survivre et de se multiplier. La conséquence est une prolifération différentielle des micro-organismes (Baquero, Negri et al. 1998).

Ainsi, la sélection de gènes ayant clairement un rôle dans la résistance aux antibiotiques peut se produire sans la pression de sélection des antibiotiques s'ils sont situés sur des réplicons qui portent également des éléments sélectionnables par l'environnement (Alonso, Sanchez et al. 2001).

### 8.2.1 Les stress environnementaux autres que les désinfectants

#### 8.2.1.1 Définition

Le stress environnemental peut-être défini comme un facteur externe ayant un effet adverse sur le bien-être physiologique des cellules bactériennes, entraînant une réduction du taux de croissance, et dans des circonstances extrêmes, l'inhibition et/ou la mort au niveau des individus ou des populations (McMahon, Xu et al. 2007). Les stress bactéricides ou bactériostatiques sont de nature très variée : températures élevées ou basses, pH, pression osmotique, carence en nutriments, irradiations, présence de composés toxiques comme les antibiotiques, les désinfectants, les métaux lourds.

#### 8.2.1.2 Liaisons entre les gènes de survie et les gènes de résistance aux antibiotiques

- Des liaisons entre les gènes de survie dans l'environnement et les gènes de résistance aux antibiotiques ont été mises en évidence, par exemple, les gènes codant pour les adhésines, qui sont des protéines qui favorisent l'adhésion des cellules aux surfaces dans les environnements liquides (Bower and Daeschel 1999; Alonso, Sanchez et al. 2001).
- Les pompes à efflux intervenant dans la survie au stress environnemental et dans la résistance aux antibiotiques
  - Les pompes à efflux sont des protéines membranaires présentes dans toutes les espèces bactériennes et chez des cellules eucaryotes. Elles sont fréquemment impliquées dans la résistance aux antibiotiques. Ces pompes ont probablement un rôle de protection contre les composés toxiques, comme les sels biliaires chez *E. coli*. Les sels biliaires font partie de l'environnement naturel d'*E. coli* depuis des millions d'années, alors que les antibiotiques ne sont utilisés que depuis moins d'un siècle. Ces pompes à efflux ont donc plus probablement été sélectionnées par la présence des sels biliaires même si maintenant, elles contribuent à la résistance intrinsèque d'*E. coli*.
  - De même, la transcription de la pompe à efflux MexABOprD, qui intervient dans la résistance aux antibiotiques chez les *Pseudomonas* est, semble-t-il, régulée par des conditions de stress

comme les chocs osmotiques ou oxydatifs, la phase stationnaire, la présence de sels biliaires ou des carences en nutriments comme le fer (Baquero, Negri et al. 1998).

- Sélection de la résistance aux antibiotiques par les procédés de ressuage et de conservation
  - Dans les aliments, il a été démontré que des procédés de conservation utilisés classiquement, comme les modifications de pH, de salinité ou des températures basses pouvaient conduire au développement de populations bactériennes montrant une sensibilité diminuée vis à vis d'antibiotiques couramment utilisés. Ces diminutions de sensibilité (augmentation de la CMI) peuvent perdurer même après le retrait du stress (McMahon, Xu et al. 2007).
  - Chez campylobacter, il a été démontré que les souches isolées après le ressuage pouvaient présenter des taux de résistance plus élevés à certains antibiotiques (tétracycline, quinolones) en fonction des types de ressuage utilisés (à l'air ou dans l'eau) (Sanchez, Fluckey et al. 2002).

#### 8.2.1.3 Liaison entre les gènes de résistance aux métaux lourds et les gènes de résistance aux antibiotiques

De même, des liaisons entre les gènes de résistance (gènes situés sur le même réplicon par exemple) aux métaux lourds et les gènes de résistance aux antibiotiques ont été mises en évidence, comme les gènes de résistance au cadmium présents dans l'environnement, l'argent (utilisé dans le traitement des brûlures) ou le mercure (présent dans les alliages de dentisterie) (Alonso, Sanchez et al. 2001).

L'accumulation de cuivre dans les sols cultivés pourrait également avoir un impact sur la sélection environnementale des antibiotiques. En agriculture, le cuivre est utilisé comme bactéricide et fongicide. C'est un oligo-élément essentiel, mais il devient toxique à forte dose. Il a été mis en évidence que les sols contaminés par les métaux lourds pouvaient contenir des pourcentages de bactéries résistantes aux antibiotiques plus élevés que les sols non contaminés. La demi-vie du cuivre dans l'environnement est évaluée à des centaines d'années et l'ensemble de ces observations conduit à émettre l'hypothèse que la pollution par les métaux lourds pourrait contribuer à augmenter la résistance aux antibiotiques, par le biais d'une sélection indirecte qui est appliquée sur de très longues périodes car les métaux ne sont pas dégradés (Berg, Tom-Petersen et al. 2005).

#### 8.2.2 Liaison entre la résistance aux désinfectants et la résistance aux antibiotiques

Un antibiotique n'est qu'une substance inhibitrice parmi d'autres contre lesquelles les bactéries doivent se défendre. Certaines bactéries ont développé des mécanismes de résistance à d'autres substances inhibitrices ou bactéricides comme les désinfectants. Les sites d'action des molécules désinfectantes sont multiples et les mécanismes de résistance des bactéries vis-à-vis de ces agents sont en général non spécifiques (pompes à efflux, modifications de la composition de la membrane plasmique...). Ces mécanismes étant non spécifiques, ils peuvent également être impliqués dans la résistance aux antibiotiques. De nombreuses études ont mis en évidence un lien entre la résistance aux désinfectants et la résistance aux antibiotiques. Deux mécanismes peuvent être à l'origine de cette observation : la co-résistance et la résistance croisée. Lors de résistance croisée, le même mécanisme est impliqué dans la résistance aux antibiotiques et aux désinfectants (par exemple les pompes à efflux, les modifications de compositions de la membrane plasmique). Lors de co-

résistance, différents mécanismes sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques d'une part, et la résistance aux désinfectants d'autre part. Les gènes porteurs de ces résistances sont placés sur le même réplicon ou sur le même élément génétique mobile, ce qui conduit à leur expression simultanée (Courvalin and Trieu-Cuot 2001).

L'application de traitements sublétaux peut induire l'expression de pompes à efflux. Même si ces pompes ne sont pas capables d'entraîner une résistance aux désinfectants aux concentrations d'utilisation, elles sont cependant capables d'entraîner une résistance aux doses thérapeutiques des antibiotiques. Il a donc été largement suspecté qu'une mauvaise utilisation des désinfectants pourrait contribuer à l'apparition et à la persistance de la résistance aux antibiotiques (Russell 1999; Russell, Suller et al. 1999; Aiello and Larson 2003). Cette hypothèse a été confirmée par des études au laboratoire sur des cultures bactériennes pures, cependant, ces observations sont difficiles à extrapoler à l'environnement général dans lequel, le plus souvent, les populations bactériennes cohabitent au sein de biofilm (Gilbert, Allison et al. 2002).

#### 8.2.2.1 Résistance croisée entre les antibiotiques et le triclosan

Le triclosan est un désinfectant dont l'utilisation n'est pas autorisée en industrie agroalimentaire. Cependant, à la différence des autres désinfectants, son mode d'action est mieux compris et il a fait l'objet de nombreuses études pour comprendre les phénomènes de résistance croisée entre le triclosan et les antibiotiques.

##### ➤ Enoyl-reductase

Des mutants d'*Escherichia coli* ont été identifiés porteurs de la cible génétique du triclosan, l'énoyl-reductase. Cette enzyme est le produit du gène *fabI*. Cette protéine est également la cible de l'isoniazide, qui est une des molécules utilisées dans le traitement de la tuberculose chez l'homme. Une mutation entraînant une modification de l'enzyme conduit à une résistance croisée entre ces deux molécules (Levy 2002).

##### ➤ Pompes à efflux

Un autre mécanisme de résistance au triclosan est lié aux pompes à efflux non spécifiques, comme la pompe AcrAB chez *Escherichia coli* et les protéines Mex chez *Pseudomonas aeruginosa*. La surexpression de ces pompes entraîne non seulement une résistance aux antibiotiques, mais également une résistance croisée au triclosan et ce phénomène est observé chez *E. coli* et chez *P. aeruginosa* (Levy 2002).

#### 8.2.2.2 Résistance croisée entre les antibiotiques et les composés d'ammoniums quaternaires

➤ Au cours de la dernière décennie, un nouveau type de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) a émergé dans la communauté urbaine, différent de celui rencontré en milieu hospitalier. Cette bactérie, nommée *S. aureus* acquis dans la communauté (cMRSA), a été isolée aux Etats-Unis, au Canada et en Australie. La caractéristique de cette bactérie est qu'elle est résistante principalement aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et pas, à la différence des souches hospitalières, à de nombreux autres antibiotiques. Des chercheurs japonais ont réussi à sélectionner des mutants cMRSA après une exposition à des composés d'ammoniums

quaternaires. Les mutants obtenus présentaient une résistance élevée à la pénicilline et aux autres antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, mais pas à d'autres antibiotiques (Levy 2002).

- Chez *E. coli*, une résistance croisée entre des antibiotiques et le chlorure de benzalkonium a été mise en évidence. Une augmentation des phénomènes d'efflux est une des différences observées chez les bactéries adaptées au chlorure de benzalkonium (Braoudaki and Hilton 2004; Langsrud, Sundheim et al. 2004, Braoudaki, 2005 #369).

#### 8.2.2.3 Résistance croisée entre les antibiotiques et la chlorhexidine

La chlorhexidine est un antiseptique cutané qui peut être utilisé pour l'hygiène des mains. Chez *Pseudomonas stutzeri*, la résistance à la chlorhexidine est liée à la résistance à des antibiotiques comme l'érythromycine et l'ampicilline et d'autres désinfectants comme le triclosan et les ammoniums quaternaires (Russell, Tattawasart et al. 1998). Cette résistance semble liée à des modifications de la membrane plasmique qui devient plus hydrophobe chez les souches mutantes (Tattawasart, Maillard et al. 1999).

### 8.3 Biofilm et résistance aux antibiotiques

Un biofilm est constitué d'un consortium de cellules enveloppées par une matrice de polymères extracellulaires (le glycocalix) et des produits de leur métabolisme. La vie au sein d'un biofilm offre probablement de nombreux avantages en terme de protection contre les agressions de l'environnement. Les bactéries présentes au sein d'un biofilm sont significativement plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les bactéries planctoniques. Différentes raisons expliquent cette observation : le biofilm fournit une protection physique contre ces agents, et les concentrations des agents antimicrobiens sont réduites par la présence de la matrice de polymères extracellulaires. Les biofilms, de par leur structure, entraîne un gradient de concentration pour les agents bactéricides, ce qui permet aux clones les moins sensibles de survivre (Gilbert, Allison et al. 2002). Le biofilm favorise également les échanges entre les bactéries et en particulier, les échanges de gènes de résistance aux antibiotiques ou aux désinfectants (McDowell 2004).

## 9 Conclusion et hypothèse

L'environnement joue un rôle dans la sélection des gènes de résistance aux antibiotiques et l'antibiorésistance n'est pas toujours la conséquence d'une pression de sélection par les antibiotiques. Les désinfectants et les stress subis par les bactéries au cours des procédés d'abattage peuvent favoriser la sélection de gènes de résistance aux antibiotiques. L'objectif du travail de thèse est d'analyser l'évolution de la résistance aux antibiotiques des campylobacters au cours des opérations de nettoyage et de désinfection et d'abattage dans les abattoirs de volailles.