



**HAL**  
open science

# Transfert d'un gène de résistance aux beta-lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : influence d'un traitement antibiotique

Stéphanie Faure

## ► To cite this version:

Stéphanie Faure. Transfert d'un gène de résistance aux beta-lactamines blaCTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : influence d'un traitement antibiotique. Médecine. Université Rennes 1, 2009. Français. NNT : . tel-00449376

**HAL Id: tel-00449376**

**<https://theses.hal.science/tel-00449376>**

Submitted on 21 Jan 2010

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

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

THESE

*présentée*

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

*pour obtenir le grade de :*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1

**Mention : Biologie et Santé**

*par*

**Stéphanie Faure**

Equipe d'accueil : unité Pharmacocinétique-Pharmacodynamie, Afssa.

Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé

Composante universitaire : Science de la vie et de l'environnement

**Transfert d'un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines *bla*<sub>CTX-M-9</sub>  
entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale  
humaine : impact d'une antibiothérapie**

SOUTENUE LE 14 mai 2009 devant la commission d'examen

**COMPOSITION DU JURY :**

**Dr. F. Doucet-Populaire, Université René Descartes, Paris**

**Pr. A. Bousquet-Mélou, INRA, Toulouse**

**Pr. C. Blanco, Université de Rennes 1, Rennes**

**Dr. P.Y. Donnio, Centre hospitalier universitaire, Rennes**

**Pr. G. Daube, Université de Liège, Belgique**

**Dr. M. Laurentie, AFSSA, Fougères**

**Mme. A. Perrin-Guyomard, AFSSA, Fougères**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Président du jury**

**Examineur**

**Examineur**

**Directeur de thèse**

**Encadrante**

## **REMERCIEMENTS**

*Je souhaiterais tout d'abord remercier Madame Florence Doucet-Populaire et Monsieur Alain Bousquet-Mélou qui ont accepté d'être rapporteur de ce manuscrit de thèse. Tous deux ont apporté des remarques précieuses et constructives dans leur rapport et lors de la soutenance.*

*Merci également à Carlos Blanco qui a été mon responsable de Master de recherche et aujourd'hui président du jury de thèse. Je remercie également Messieurs Pierre-Yves Donnio et Georges Daube en tant qu'examineurs pour leurs commentaires.*

*Je remercie l'Unité de Bactériologie de l'AFSSA-Lyon qui m'a accueillie chaleureusement dans son laboratoire et avec qui la collaboration a été un réel plaisir. Merci à Jean-Yves Madec, Pierre Châtre, Danièle Meunier et Corinne Lazizzera.*

*Je voudrais désormais remercier Pascal Sanders, le directeur du laboratoire pour m'avoir accueillie au sein de son établissement, pour ses discussions scientifiques et son ouverture d'esprit.*

*Merci à Michel Laurentie, mon directeur de thèse, de m'avoir formé en pharmacocinétique-pharmacodynamie. Merci de m'avoir fait confiance et encouragé dans ce projet de recherche. Merci également pour votre enthousiasme.*

*Un grand merci à Agnès Perrin-Guyomard, mon encadrante, qui est à l'origine de ce projet de thèse. Tout d'abord merci pour ta rigueur, ton sens critique, tes conseils et ta disponibilité. Merci également pour ta sympathie, ton écoute, ta sincérité et ton amitié.*

*Merci aussi à toute l'unité pharmacocinétique-pharmacodynamie qui a participé de près ou de loin à ce projet de recherche : Jean-Michel Delmas, Jacqueline Manceau, Jean-Guy Rolland, Stéphane Marteau, Paméla Louapre, Catherine Poirier, Mireille Bruneau et Antoine Huguet, notre « père spirituel ». Merci pour votre implication et votre soutien.*

*Je remercie chaleureusement l'unité toxicologie et particulièrement Valérie Fessard alias « Fessardus toxicus » pour tes précieux conseils, ton soutien, ton oreille attentive, ta bonne humeur et ton dynamisme. Une petite pensée à Ludo, Anne-Laure, M'dame chiffon, Annick, la miss Rachelle et sacré Gégé.*

*Je pense bien sûr à tous les thésards grâce à qui, ces trois années resteront inoubliables : Manue, Jérôme, Julie, Juju et Perrine.*

*Je remercie également toutes les personnes que je n'ai pas citées, elles se reconnaîtront.*

*Je terminerai en remerciant ma famille et plus particulièrement Fabien Cherel pour m'avoir soutenue, encouragée, conseillée. Je lui dédie cette thèse.*

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>4</b>
<b>I. LA PHARMACOLOGIE DES ANTIBIOTIQUES</b> .....	<b>6</b>
<b>I.A. Détermination d'un schéma thérapeutique</b> .....	<b>6</b>
I.A.1. Intérêt de la détermination d'un schéma posologique optimal .....	8
I.A.2. Approche dose-titration .....	8
I.A.3. Approche PK/PD .....	12
I.A.3.a. Principe de pharmacocinétique et paramètres associés .....	12
I.A.3.b. Principe de pharmacodynamie et paramètres associés .....	18
<b>I.B. Les <math>\beta</math>-lactamines</b> .....	<b>30</b>
I.B.1. Structure et propriétés des $\beta$ -lactamines .....	30
I.B.2. Mode d'action des $\beta$ -lactamines : Inhibition de la synthèse de la paroi .....	32
I.B.3. Spectre d'activité des $\beta$ -lactamines .....	35
I.B.4. Propriétés pharmacocinétiques des $\beta$ -lactamines chez l'homme.....	36
I.B.5. Utilisation en médecine humaine et vétérinaire .....	40
<b>II. LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES</b> .....	<b>42</b>
<b>II.A. Définitions de la résistance bactérienne aux antibiotiques</b> .....	<b>42</b>
<b>II.B. Résistance naturelle, acquise, croisée et co-résistance</b> .....	<b>44</b>
<b>II.C. Mécanismes de résistance aux <math>\beta</math>-lactamines non enzymatiques</b> .....	<b>45</b>
II.C.1. Diminution de la perméabilité .....	45
II.C.2. Excrétion par des systèmes d'efflux .....	47
II.C.3. Modification des PLPs.....	47
<b>II.D. Mécanismes de résistance aux <math>\beta</math>-lactamines enzymatiques</b> .....	<b>49</b>
II.D.1. Les $\beta$ -lactamases .....	49
II.D.2. Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) .....	54
II.D.3. Les céfotaximases ou CTX-M.....	55
II.D.4. Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases et la résistance associée.....	56
<b>II.E Supports génétiques et mobilité de la résistance aux <math>\beta</math>-lactamines</b> .....	<b>58</b>
II.E.1. Les supports génétiques .....	58
II.E.1.a. Le chromosome et les plasmides .....	58
II.E.1.b. Les éléments transposables et les intégrons.....	59
II.E.2. Le transfert horizontal de gènes de résistance .....	65
II.E.2.a. La transformation ou compétence naturelle .....	67
II.E.2.b. La transduction .....	69
II.E.2.c. La conjugaison .....	69

<b>III. LA DISSEMINATION DE LA RESISTANCE .....</b>	<b>72</b>
<b>III.A. Réservoir de la résistance aux antibiotiques .....</b>	<b>72</b>
III.A.1. La flore intestinale : un compartiment de sélection .....	72
III.A.2. Les entérobactéries .....	73
<b>III.B. Prévalence de la résistance aux C3G chez les entérobactéries .....</b>	<b>75</b>
III.B.1. En élevage .....	75
III.B.2. Chez l'homme .....	77
<b>III.C. Transmission de la résistance à l'homme.....</b>	<b>81</b>
III.C.1. La transmission directe.....	83
III.C.2. La transmission <i>via</i> l'alimentation d'origine animale.....	84
III.C.3. Le transfert de gène de résistance de l'animal à l'homme .....	85
<b>III.D. Impact d'une pression de sélection .....</b>	<b>88</b>
III.D.1. Impact d'un antibiotique sur l'écosystème intestinal et la résistance .....	88
III.D.2. Impact d'un antibiotique sur le transfert de gène de résistance .....	89
 <b>PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS .....</b>	 <b>90</b>
 <b>RESULTATS .....</b>	 <b>93</b>
<b>ARTICLE 1.....</b>	<b>94</b>
Impact d'un traitement au céfixime sur le transfert du gène de résistance <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> de <i>Salmonella enterica</i> Virchow à <i>Escherichia coli</i> dans des rats gnotobiotiques.....	94
<b>ARTICLE 2.....</b>	<b>103</b>
Transfert du gène <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> de <i>Salmonella enterica</i> Virchow aux entérobactéries chez des rats associés à une flore humaine : impact d'un traitement au céfixime.....	103
<b>ARTICLE 3.....</b>	<b>129</b>
Etude Pharmacocinétique-Pharmacodynamique du céfixime vis-à-vis de <i>Escherichia coli</i> et <i>Salmonella enterica</i> Virchow productrices de $\beta$ -lactamase à spectre étendu ...	129
 <b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	 <b>155</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	 <b>167</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

- AFSSA** Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
**AFSSAPS** Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé  
**AUC** Aire sous la courbe, traduit de l'anglais « area under the curve »  
**AUIC** Aire sous la courbe d'inhibition, traduit de l'anglais « area under the inhibitory curve »  
**BHI** Gélose ou bouillon Brain Heart Infusion  
**BMH** Bouillon Mueller-Hinton  
**BMR** Bactérie Multi-résistante  
**BLSE**  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (traduit en anglais ESBL extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)  
**CA-SFM** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie  
**CL-MS** Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse  
**CLSI** Clinical and Laboratory Standards Institute  
**CMB** Concentration Minimale Bactéricide  
**CMI** Concentration Minimale Inhibitrice  
**CTX-M** Céfotaximase  
**EARSS** European Antimicrobial Resistance Surveillance System  
**EPA** Effet Post-Antibiotique  
**GMH** Gélose Mueller-Hinton  
**GTS** Gélose trypticase de soja  
**ISB** Index de Bactéries Survivantes, traduit de l'anglais « Index of Surviving Bacteria »  
**LOD** Limite of Détection  
**LPS** Lipolysaccharide  
**LOQ** Limite of Quantification  
**MAR** Multi antibiotic resistance  
**MAT** Temps moyen d'absorption, traduit de l'anglais « mean absorption time »  
**MC** Gélose Mac Conkey  
**MDR** Résistance à de multiples antibiotiques, traduit de l'anglais « Multi-Drug Resistance »  
**MPC** Concentration de prévention de mutants, traduit de l'anglais « Mutant Prevention Concentration »  
**NCCLS** National Committee for Clinical Laboratory Standards  
**OMP** ou **Omp** Protéine de la membrane externe ou porine (ex OmpF), traduit de l'anglais « Outer Membrane Protein »  
**OMS** Organisation mondiale de la Santé  
**PCB** Première Concentration Bactéricide  
**PCR** Amplification en chaîne par polymérase, traduit de l'anglais « Polymerase Chain Reaction »  
**PD** Pharmacodynamique ou pharmacodynamie, traduit de l'anglais « Pharmacodynamic »  
**PK** Pharmacocinétique, traduit de l'anglais « Pharmacokinetic »  
**PK/PD** Pharmacocinétique/Pharmacodynamique  
**PLP** Protéine Liant la Pénicilline  
**SME** Effet de concentrations sub-inhibitrices, traduit de l'anglais « Sub-MIC Effect »  
**UFC** Unité Formant Colonie (traduit en anglais **CFU** Colony forming Unit)

# *INTRODUCTION*

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Depuis leur première utilisation en 1942, les  $\beta$ -lactamines représentent la famille d'antibiotiques la plus largement développée et la plus diversifiée dans le monde. Cette utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et le faible coût de certaines molécules.

Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques, en ville comme à l'hôpital, a modifié considérablement l'écologie microbienne et tend à augmenter le taux de bactéries résistantes. Le pouvoir d'adaptation des bactéries se manifeste par leur capacité à s'approprier de nouvelles propriétés soit par modification de leur génome (mutations) soit par acquisition d'informations génétiques par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles que sont les plasmides et les éléments transposables. La plupart des espèces bactériennes sont capables d'intégrer dans leur génome différents déterminants de résistance. Ainsi la dissémination de gènes de résistance entre bactéries a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques (bactéries multi-résistantes ou BMR) en particulier les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM), les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). Le facteur aggravant concerne la diffusion de la multi-résistance des bactéries pathogènes au sein des différents écosystèmes tels que l'homme et l'animal. Ainsi la transmission de la résistance se distingue par trois niveaux de circulation : la diffusion des souches bactériennes résistantes (d'hôte à hôte), le transfert horizontal de plasmides (de bactéries à bactéries) et la dispersion de transposons (ADN à ADN).

En médecine vétérinaire, les élevages d'animaux sont particulièrement propices à l'émergence de bactéries résistantes à certains antibiotiques. D'une part, l'utilisation des antibiotiques à des fins prophylactiques, métaphylactiques ou curatives y est fréquente, d'autre part, la promiscuité entre les animaux favorise la dissémination de la résistance. Les conséquences pour l'homme de la sélection de bactéries résistantes dans les élevages sont difficiles à évaluer. Toutefois, l'exposition directe aux animaux et l'ingestion de denrées alimentaires contaminées représentent une source de bactéries résistantes. L'évaluation du risque pour l'homme associé à ces bactéries nécessite d'estimer tant la possibilité d'une contamination et d'une persistance de ces souches dans la flore intestinale humaine que la probabilité d'une dissémination de gènes de résistance au sein de cette flore et enfin

l'éventualité d'une rupture de la flore de barrière sous la pression de sélection d'un traitement aux antibiotiques.

Dans ce contexte, ce travail a été entrepris afin :

- d'évaluer le transfert d'un gène de résistance d'une salmonelle d'origine animale aux entérobactéries de la flore intestinale humaine *in vitro* versus *in vivo*.
- d'identifier l'impact d'un traitement antibiotique sur le transfert de gènes à l'aide d'un modèle de rat axénique ou associé à une flore humaine.
- de déterminer les paramètres prédictifs de l'efficacité d'un traitement en présence de telles souches

# *ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

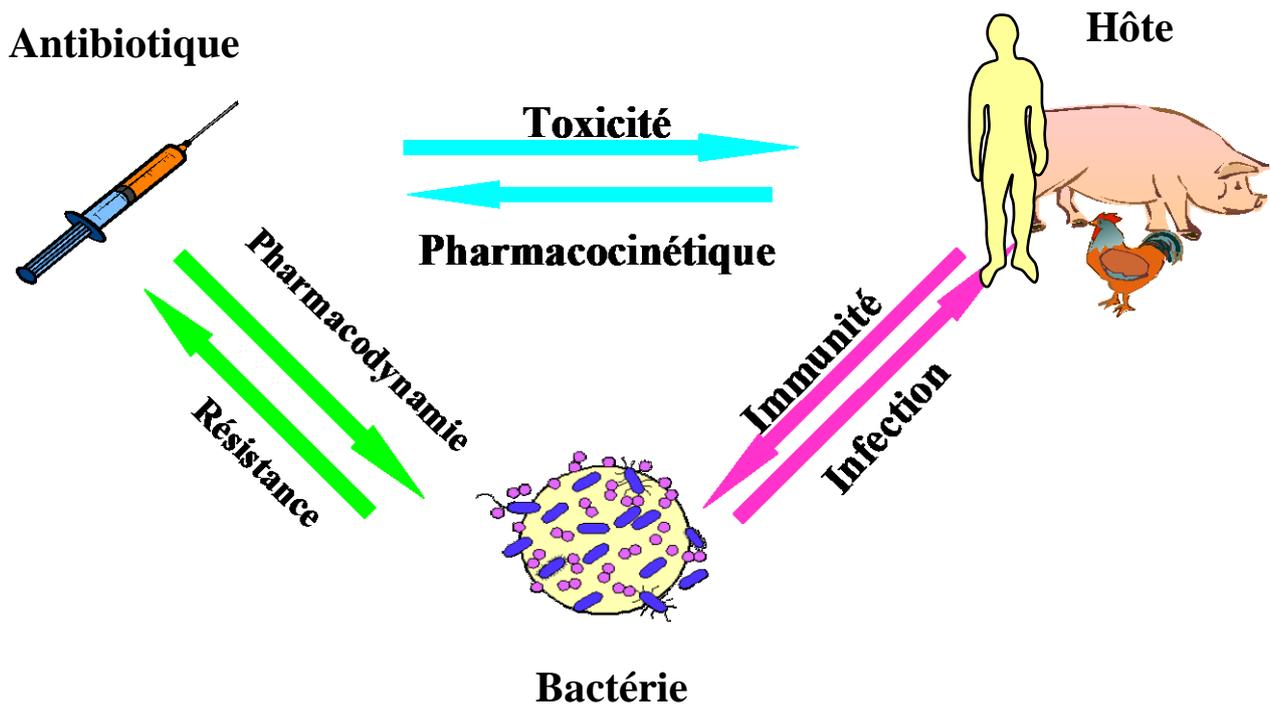


Figure 1. Représentation de la relation bactérie-hôte-antibiotique.

## I. LA PHARMACOLOGIE DES ANTIBIOTIQUES

Durant ces 50 dernières années, l'introduction des antibiotiques a représenté une révolution de la médecine souvent largement sous-estimée. Jusqu'à là, les infections bactériennes étaient la première cause de mortalité, en particulier chez les enfants et les personnes âgées. A l'origine, les antibiotiques sont des molécules produites par le métabolisme secondaire de certains micro-organismes, bactéries ou champignons, comme *Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Cephalosporinium*, etc. Ces substances naturelles, non toxiques pour l'hôte, exercent une toxicité sélective vis à vis de leur cible. La découverte de nouvelles molécules et leur développement à l'échelle industrielle a conforté l'idée que les infections bactériennes pouvaient être vaincues. Cependant, l'utilisation massive et parfois mal contrôlée de ces agents a conduit à la sélection de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques. Désormais, la prescription d'un agent antimicrobien particulier doit prendre en compte non seulement l'effet recherché vis-à-vis de l'agent pathogène mais également l'effet produit sur l'écologie bactérienne et donc sur la collectivité. Le développement des médicaments repose sur l'analyse des relations existantes entre les doses, les effets thérapeutiques et les effets indésirables de ces médicaments tels que l'émergence de bactéries résistantes.

### I.A. Détermination d'un schéma thérapeutique

L'antibiothérapie se traduit par une interaction dynamique entre trois facteurs : l'hôte, l'antibiotique et l'organisme infectant (figure 1). Dans ce contexte, la pharmacocinétique (PK) décrit le devenir du médicament chez l'hôte, c'est à dire l'évolution des concentrations en antibiotique actif dans les liquides biologiques, le plus souvent le plasma. Elle se compose de 4 phases : l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion, connue sous l'acronyme ADME (83). La métabolisation et l'excrétion correspondent à une unique phase appelée l'élimination. La pharmacodynamie (PD) caractérise quant à elle, l'effet de l'antibiotique au niveau du site d'infection. Pour les antibiotiques, les paramètres PD généralement mesurés *in vitro* sont les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ou les concentrations minimales bactéricides (CMB) vis-à-vis des populations bactériennes. La relation PK/PD relie les concentrations d'antibiotiques dans l'organisme et les effets des concentrations sur les bactéries visées (221).

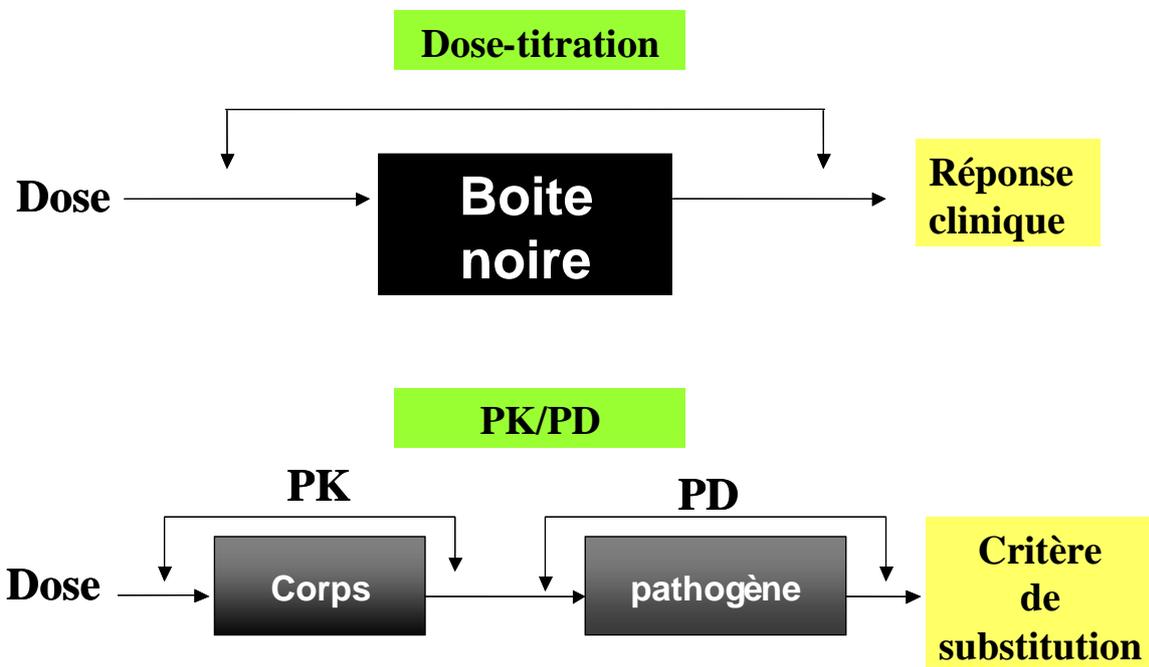


Figure 2. Représentation schématique des relations entre les schémas posologiques par l'approche dose-titration et PK/PD d'après Toutain *et al.* (2004).

### I.A.1. Intérêt de la détermination d'un schéma posologique optimal

Lors d'infections bactériennes, l'objectif de l'antibiothérapie est non seulement le succès clinique mais également la contribution à l'éradication de la bactérie cible. L'antibiothérapie a montré son efficacité lors d'infections bactériennes, cependant des échecs du traitement peuvent parfois être observés. Ceux-ci se traduisent par des signes cliniques aggravant, persistant voire associés à une rechute du patient. Les causes d'échecs sont souvent difficiles à identifier cependant certains points critiques peuvent être évoqués. Les échecs les plus fréquemment rencontrés sont les échecs liés : au malade (traitement mal observé, prescription non suivie, vomissement, collapsus, hôte immunodéprimé), à la posologie de l'antibiotique (traitement insuffisant, pénétration défectueuse, inactivation) ou encore aux microbes (erreur sur l'identification du pathogène, l'acquisition de résistance pendant le traitement, les surinfections et substitutions de la flore, la bactéricidie insuffisante, l'effet inoculum, la persistance bactérienne etc ...). En effet, si l'élimination du germe pathogène n'est pas totale, les populations bactériennes peu sensibles sont susceptibles de coloniser l'individu avec le risque que les bactéries résistantes deviennent prédominantes créant un risque de rechute chez le sujet traité mais également un risque de dissémination de souches résistantes vers d'autres sujets (66). De ce fait, il est essentiel d'établir un schéma posologique optimal permettant un maximum d'efficacité clinique tout en minimisant les effets néfastes tels que la toxicité, l'apparition de bactéries résistantes ou encore la présence de résidus d'antibiotiques dans le cas des animaux de rente.

Le schéma posologique d'un antibiotique se définit par la dose, l'intervalle d'administration, la durée du traitement, la voie et le site d'administration, les modalités d'administration (à jeun, pendant le repas) et la technique d'administration (bolus, perfusion). Les deux principaux concepts pour la détermination d'un schéma thérapeutique efficace sont l'approche dose-titration et l'approche PK/PD (figure 2).

### I.A.2. Approche dose-titration

Contrairement aux médicaments agissant sur le système physiologique de l'hôte, l'action des antibiotiques peut être testée chez un animal expérimentalement ou spontanément infecté par les bactéries cibles et non chez un individu sain.

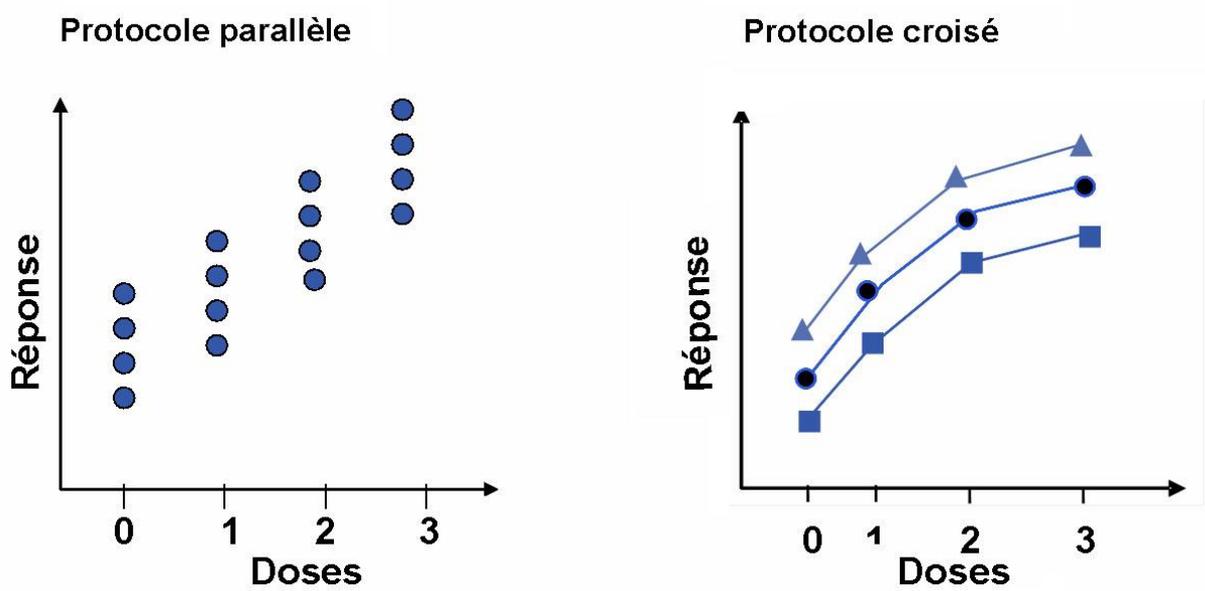


Figure 3. Détermination de la dose efficace par l'approche dose-titration selon un protocole croisé ou parallèle d'après Toutain *et al.*(2004).

La plupart des schémas posologiques proposés en antibiothérapie dans le cadre de la mise sur le marché sont basés sur une approche de dose-titration avec une confirmation par des essais cliniques.

L'approche dose-titration peut être réalisée suivant deux protocoles : le protocole dit « parallèle » ou le protocole « croisé » aussi appelé « crossover » (figure 3).

La première méthode consiste en un protocole « parallèle ». Des animaux, mis en groupes de manière aléatoire, sont infectés expérimentalement. Chacun des groupes reçoit une dose différente, le groupe témoin recevant un placebo. L'analyse statistique se base sur l'hypothèse d'égalité de réponse entre les groupes. Une relation dose-effet ou dose-réponse permettant de sélectionner la dose donnant une réponse clinique satisfaisante est établie (221). Cependant cette première méthode ne permet d'obtenir qu'une réponse moyenne au sein de chaque groupe/dose sans avoir d'information sur l'évolution de la courbe dose-réponse pour chaque animal d'où un manque d'informations individuelles pour l'effet dose (221).

La deuxième méthode consiste en un protocole croisé. Chaque animal, après avoir été infecté, reçoit les différentes doses ce qui permet d'obtenir des courbes dose-réponse individuelles avec une réduction des variabilités et donc un système d'analyse des relations dose-réponse plus puissant. La prédiction dose-réponse est obtenue par l'ajustement des données avec un modèle pharmacodynamique comme le modèle  $E_{max}$  équivalent au modèle de Michaelis et Menten. L'utilisation de modèles expérimentaux d'infection sévère entraîne un fort taux de mortalité, ce qui nécessite d'augmenter l'effectif de l'échantillon. Cette approche ne correspond pas forcément à la réalité de la pathologie sur le terrain. Par ailleurs la réponse est évaluée avec des critères cliniques difficiles à définir ne permettant pas de savoir si l'infection est totalement éradiquée et s'il y a un risque d'émergence de résistance à l'antibiotique. Les résultats ne sont alors significativement différents de ceux du placebo que pour les doses les plus fortes. Cela entraîne par la suite une recommandation d'utilisation de fortes doses qui ne sont pas forcément optimisées (221). La méthodologie de l'essai clinique de type dose-titration est donc inadaptée et peu puissante pour la sélection et l'optimisation de schémas thérapeutiques. Pour pallier aux carences méthodologiques de la dose-titration en terme d'efficacité clinique et de minimisation du risque d'émergence de résistance à l'antibiotique, les voies de recherche en antibiothérapie se sont axées sur l'approche pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD). Cette approche détaille les processus

Tableau 1. Principaux paramètres pharmacocinétiques.

Nom	Acronyme	Unité	Définition
Aire sous la courbe	ASC ou AUC	mg/h/l	Surface sous la courbe des concentrations en fonction du temps
Temps de demie-vie d'élimination plasmatique	$t_{1/2 \text{ élimination}}$	h	Temps nécessaire pour diviser par 2 les concentrations plasmatiques dans la phase terminale
Clairance plasmatique totale	$Cl_T$	l/h	Volume sanguin totalement débarrassé de la substance par unité de temps
Concentration maximale	$C_{max}$	mg/l	Concentration maximale observée de molécule dans le plasma
Temps d'obtention de $C_{max}$	$T_{max}$	h	Temps d'obtention de la concentration maximale
Concentration à l'équilibre	Ceq ou C <sub>ss</sub>	mg/l	Concentration plasmatique moyenne à l'état d'équilibre c'est à dire lorsque les quantités de médicament administrées sur l'intervalle de dosage compensent les quantités éliminées
Biodisponibilité	$F$	%	Fraction de la dose atteignant la circulation sanguine
Volume de distribution	$V$	l	Constante de proportionnalité entre le taux d'élimination d'une molécule et ses concentrations plasmatiques

intervenant entre l'administration d'une dose et la réponse clinique permettant alors de déterminer un schéma thérapeutique efficace (64).

### I.A.3. Approche PK/PD

Les études PK/PD des antibiotiques sont menées avant tout pour étudier le parallélisme entre l'évolution des concentrations *in situ* dans le temps et l'évolution de la taille de la population bactérienne exposée. Les schémas expérimentaux intègrent alors les deux aspects évolutifs pharmacocinétique et pharmacodynamique des antibiotiques (figure 2). Le profil des concentrations en fonction du temps est en général réduit aux paramètres pharmacocinétiques rapportés à la CMI, utilisés en tant que critère PK/PD en lien avec les aspects cliniques. Les cinétiques de bactéricidie peuvent également être exprimées comme des mesures de l'effet sur la population bactérienne. La relation entre les traitements antibiotiques et l'élimination des bactéries peut être étudiée par différents modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* sur des animaux de laboratoire. La limite principale des modèles *in vitro* est qu'ils ne tiennent pas compte de la réponse du système immunitaire. Quant à l'utilisation de modèles animaux, l'extrapolation à l'homme doit prendre en compte la physiologie et l'anatomie différente de l'animal vis-à-vis de celle de l'homme.

#### *I.A.3.a. Principe de pharmacocinétique et paramètres associés*

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un principe actif contenu dans un médicament dans l'organisme (122). Elle comprend quatre phases, se déroulant simultanément : absorption, distribution, métabolisme et l'excrétion du principe actif. Chaque processus pharmacocinétique est caractérisé par un ou plusieurs paramètres (tableau 1).

#### **L'absorption**

Avant d'atteindre la circulation générale, l'antibiotique doit passer à travers une ou plusieurs membranes biologiques lorsqu'il est administré par une voie extravasculaire.

L'absorption correspond donc au passage de l'antibiotique de son site d'administration jusqu'à la circulation générale. Plusieurs mécanismes de passage transmembranaire des xénobiotiques existent comme la diffusion passive, la filtration ou encore le transport actif. Les facteurs limitant de l'absorption peuvent être le caractère lipophile ou ionisé de la molécule, les interactions avec d'autres substances, la présence d'aliments, le débit sanguin, la vidange gastrique et les pathologies. Après l'absorption digestive, avant même d'atteindre la circulation générale, le produit peut-être métabolisé lors du passage dans le foie : c'est l'effet de **premier passage hépatique** (193). Il en résulte une diminution de la quantité disponible pour le site infectieux. Ce premier passage n'est pas uniquement de type hépatique mais peut être gastrique, intestinal, pulmonaire, tissulaire, vasculaire et cutanée. Pour évaluer l'absorption d'un antibiotique, la biodisponibilité absolue ou relative d'une molécule est déterminée. Elle correspond au pourcentage de la dose administrée qui atteint la circulation générale à une certaine vitesse, en prenant en compte les phénomènes d'absorption et de premier passage (122).

**La biodisponibilité absolue** ( $F_a$ ) tient compte de la concentration plasmatique obtenue après une administration extravasculaire par comparaison à la concentration plasmatique obtenue après une administration par une voie de référence (219). En général, la voie de référence est la voie intraveineuse pour laquelle la biodisponibilité est de 100%. La  $F_a$  ne peut être supérieur à 100 %. L'équation mathématique permettant le calcul de la biodisponibilité absolue est la suivante :

$$F_a = \frac{AUC_{EV} \times Dose_{IV}}{AUC_{IV} \times Dose_{EV}} \times 100$$

avec l'AUC définie comme l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques obtenue après une administration par voie extravasculaire ( $AUC_{EV}$ ) ou par voie intraveineuse ( $AUC_{IV}$ ).

**La biodisponibilité relative** ( $F_r$ ) également exprimée en pourcentage, est obtenue en comparant deux formulations administrées par la même voie extravasculaire ou en comparant deux voies extravasculaires pour la même formulation (219). La biodisponibilité relative peut être inférieure, égale ou supérieur à 100%. L'équation est :

$$F_r = \frac{\text{AUC}_{\text{EVt}} \times \text{Dose}_{\text{EVr}}}{\text{AUC}_{\text{EVr}} \times \text{Dose}_{\text{EVt}}} \times 100$$

avec l'AUC correspondant à l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques après une voie extravasculaire de référence (AUC<sub>EVr</sub>) ou une voie extravasculaire testée (AUC<sub>EVt</sub>).

### **La distribution**

Une fois la circulation générale atteinte, l'antibiotique est réparti dans l'ensemble des tissus et organes. Cette distribution dépend essentiellement des liaisons de l'antibiotique aux protéines plasmatiques, de l'affinité pour les protéines tissulaires, de l'irrigation des organes et des barrières que l'organisme met en œuvre pour se protéger. Un antibiotique sera mieux distribué s'il est faiblement lié aux protéines plasmatiques, s'il a une forte affinité pour les protéines tissulaires, et si les tissus et organes concernés sont bien perfusés. La distribution tissulaire se définit par le volume de distribution, c'est-à-dire le volume théorique dans lequel l'antibiotique devrait se répartir pour être à la même concentration que celle du plasma, et la vitesse de distribution qui est la vitesse à laquelle le médicament va passer d'un compartiment à l'autre (220). Le volume de distribution est une simple constante de proportionnalité entre la quantité de substance dans l'organisme et les concentrations plasmatiques mesurées. En pratique, trois volumes de distribution sont calculés : le volume de distribution initial ( $V_c$ ), le volume de distribution à l'équilibre ( $V_{ss}$ ) et le volume de distribution apparent ( $V_b\beta$ ).

Le volume apparent de distribution donne une approximation de l'étendue de la distribution de l'antibiotique sans précision anatomique et peut être modifié par l'état physiologique ou par certaines pathologies telles que l'insuffisance rénale, hépatique ou cardiaque (122).

### **La métabolisation**

Les antibiotiques sont plus ou moins métabolisés dans l'organisme par les systèmes enzymatiques intestinaux, rénaux ou hépatiques. Les enzymes du groupe des cytochromes P450 donnant lieu à différents métabolites de phase I par réaction d'hydrolyse, de réduction ou d'oxydation (99). Les réactions de phase II dites de conjugaison permettent le transfert sur

la molécule de D-glucuronate, de sulfate, d'alcools aliphatiques...etc. Ces réactions rendent la molécule plus hydrosoluble permettant une meilleure élimination par les reins.

La majorité des antibiotiques hydrosolubles comme les aminosides, les  $\beta$ -lactamines et les glycopeptides, ne sont que très peu métabolisés. Cependant dans certains cas, les antibactériens sont administrés sous forme de précurseur de l'antibiotique dont la métabolisation permettra le relargage du métabolite actif, ce sont les prodrogues. Un exemple est le cefpodoxime proxétile. Il s'agit d'un ester hydrolysé au niveau du tractus gastro-intestinal ou du foie permettant ainsi la libération du principe actif : le cefpodoxime.

### L'excrétion

Les voies principales d'excrétion des antibiotiques sous forme initiale ou après diverses biotransformations sont l'excrétion rénale, fécale et hépatique. Elles se caractérisent par la demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$  élimination) et ou par la clairance totale ( $Cl_T$ ) qui est égale à la somme de toutes les clairances. L'élimination des molécules par le rein est la somme de trois mécanismes : la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire. Les deux premières servent à l'élimination des molécules par filtration passive des molécules de masse molaire  $< 60$  kDa tandis que le troisième mécanisme s'oppose à cette élimination par une réabsorption active ou passive des molécules. Les produits non-absorbés passent alors directement dans l'intestin puis sont éliminés dans les fécès. Lorsque les médicaments sont éliminés par excrétion biliaire, sous forme de conjugué dans la bile, les composés sont déversés au niveau duodénal et peuvent subir une hydrolyse pour redonner naissance à la molécule initiale. Celle-ci est résorbée et rejoint en partie la circulation générale. Il s'agit d'un **cycle entéro-hépatique** (193).

La clairance totale ( $Cl_T$ ) ou systémique de l'antibiotique exprime la capacité de l'organisme à épurer une substance ayant atteint la circulation générale. Par définition c'est le volume sérique ou plasmatique totalement épuré d'une substance par unité de temps. La clairance totale est la somme de la clairance rénale et de la clairance non-rénale. L'équation générale est la suivante :

$$Cl_T = \frac{\text{Dose}_{IV}}{AUC_{IV}} = Cl_R + Cl_{ER}$$

avec  $Cl_R$  la clairance rénale,  $Cl_{ER}$  la clairance extra-rénale (clairance hépatique, clairance métabolique liée à l'activité de biotransformation des poumons, des intestins et d'autres organes). La clairance est exprimée en l/h/kg.

La clairance, la biodisponibilité et le volume de distribution sont les principaux paramètres pharmacocinétiques des xénobiotiques. A ces paramètres, il faut ajouter entre autre la notion de demi-vie d'élimination. Le temps de demi-vie d'élimination ( $t_{1/2 \text{ élimination}}$ ) correspond au temps nécessaire pour diminuer de moitié la concentration plasmatique en antibiotique une fois que le pseudo-équilibre de distribution est atteint. Cette diminution s'explique par les processus d'élimination et ne traduit pas uniquement la capacité d'élimination de l'organisme (122). Le  $t_{1/2 \text{ élimination}}$  est un paramètre hybride et prend en compte les paramètres pharmacocinétiques tels que la clairance et le volume de distribution. L'équation permettant le calcul du  $t_{1/2 \text{ élimination}}$  est :

$$t_{1/2 \text{ élimination}} = \frac{0,693 \times Vd}{Cl_T}$$

D'un point de vue physiologique, le  $t_{1/2 \text{ élimination}}$  n'est pas un bon critère pour évaluer la capacité de l'organisme à éliminer un xénobiotique. Une autre manière de mesurer l'élimination du médicament est le temps moyen de séjour (MRT pour « Mean Residence Time »), l'intervalle moyen pendant lequel une molécule de médicament reste dans l'organisme après l'injection rapide d'une dose intraveineuse unique. De même que la clairance, cette valeur est indépendante de la dose.

### **Quelle est la concentration d'intérêt ?**

Lors d'une antibiothérapie, le choix du schéma posologique implique la prise en compte des paramètres pharmacocinétiques à savoir la présence de concentrations d'antibiotiques adéquates au niveau du site infectieux. Dans la plupart des cas, il est reconnu que les bactéries pathogènes d'intérêt clinique sont localisées dans le milieu extracellulaire ou les liquides interstitiels (203). Les critères de substitution sont donc fondés sur des concentrations plasmatiques et non sur des concentrations tissulaires (221). De plus, seule la fraction libre d'antibiotique, c'est-à-dire non liée aux protéines et autres molécules, agit sur les bactéries. A l'exception du plasma, les liquides interstitiels sont habituellement difficiles à prélever, or la concentration plasmatique libre est sensiblement identique à la concentration

Tableau 2. Principaux paramètres pharmacodynamiques.

Nom	Acronyme	Unité	Définition
Concentration minimale inhibitrice	CMI	mg/l	Première concentration en antibiotique sans croissance visible de la population bactérienne
Concentration minimale bactéricide	CMB	mg/l	Première concentration en antibiotique permettant une réduction d'un facteur 1000 de l'inoculum
Effet post-antibiotique ( <i>in vitro</i> )	EPA	h	Différence de temps nécessaire à l'obtention d'une recroissance d'un log par rapport à un témoin sans antibiotique

sous forme libre dans l'espace interstitiel lorsqu'il n'y a pas de barrières empêchant la diffusion. De ce fait, la concentration plasmatique en antibiotique libre apparaît comme le meilleur indicateur directement rapporté à l'antibiotique prédisant le succès clinique.

#### *I.A.3.b. Principe de pharmacodynamie et paramètres associés*

Par définition, la pharmacodynamie représente l'effet d'une substance active sur un organisme. Pour les antibiotiques, cet effet est l'action sur une population bactérienne pathogène cible et est classiquement mesuré *in vitro* par la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou la concentration minimale bactéricide (CMB). Cependant la CMI et la CMB résultent d'un effet antibactérien pendant un temps et des conditions donnés et ne suffit pas à décrire l'efficacité d'un antibiotique au cours du temps. Ce sont des paramètres statiques. Il existe cependant la possibilité d'étudier la dynamique de l'activité antibiotique par l'étude des cinétiques de bactéricidie. Les principaux paramètres pharmacodynamiques sont représentés dans le tableau 2.

#### **Etude statique : la CMI et la CMB**

La « sensibilité » ou la « résistance » d'une souche vis-à-vis d'un antibiotique ne peut être directement mesurée mais peut être déduite de l'activité de l'antibiotique *in vitro*. La méthode la plus simple et la plus répandue pour mesurer l'activité intrinsèque d'un antibiotique est la **détermination de la CMI** ou la **CMB**. Par définition, la CMI correspond à la plus petite concentration capable d'inhiber la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation de 16 à 24 h à 37°C. La CMI peut être influencée par de nombreux facteurs comme la taille de l'inoculum, le pH du milieu de culture, le temps de contact...etc. Ainsi, les différentes méthodes de détermination des CMI comme la méthode de dilution en milieu solide, en milieu liquide (macro- ou micro-méthode), les E-test ou encore les méthodes automatisées sont désormais standardisées. Afin de prédire l'effet d'un l'antibiotique vis-à-vis d'une souche bactérienne, d'aider le clinicien dans sa prescription courante ou encore d'évaluer le suivi de la résistance en hôpital

Tableau 3. Exemple de critères d'interprétation des CMI d'antibiotiques utilisé en médecine humaine pour *Enterobacteriaceae* selon différents comités d'expert nationaux et internationaux.

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/l)									
	CLSI <sup>1</sup>		EUCAST <sup>2</sup>		EUCAST <sup>2</sup>	CA-SFM-hum <sup>3</sup>		CA-SFM-vet <sup>3</sup>		
			CC clin		CC épidémiol					
	S <sup>4</sup>	R <sup>4</sup>	S	R	NS <sup>5</sup>	S	R	S	R	
Ampicilline	≤ 8	≥ 32	≤2	>8	>8	≤2	>8	-	-	
Céfotaxime	≤ 8	≥ 64	≤1	>2	>0,25	≤1	>2	-	-	
Cefixime	≤ 1	≥ 4	≤1	>1	-	≤1	>2	-	-	
Céfalexine	-	-	≤16	>16	>16	≤8	>32	≤8	>32	
Cefquinome <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	≤2	>4	
Ceftiofur <sup>6</sup>	-	-	-	-	>1	-	-	≤2	>4	
Acide nalidixique	≤ 16	≥ 32	-	-	-	≤8	>16	≤8	>16	
Ciprofloxacine	≤ 1	≥ 4	≤0.5	>1	>0,032	≤0,5	>1	-	-	
Tétracycline	≤4	≥ 16	-	-	>8	≤4	>8	≤4	>8	
Rifampicine	-	-	-	-	-	≤4	>16	-	-	

<sup>1</sup> CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006)

<sup>2</sup> EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; CC clin : Concentrations critiques cliniques; CC épidémiol : Concentrations critiques épidémiologiques (EUCAST, 2009)

<sup>3</sup> CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - recommandations adaptées à la médecine humaine (-hum) et à la médecine vétérinaire (-vet) (CA-SFM, 2009)

<sup>4</sup> S : Sensible ; R : Résistant

<sup>5</sup> NS : Non-sauvage

<sup>6</sup> Molécules spécifiquement vétérinaires

ou dans l'environnement, les valeurs de CMI sont confrontées à des valeurs de CMI critiques permettant ainsi **la catégorisation des souches bactériennes** vis-à-vis d'un antibiotique (3, 11, 41). Dans la pratique quotidienne, les souches catégorisées « **sensibles** » sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement systémique et aux posologies habituellement recommandées. Les souches catégorisées « **résistantes** » sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique, quel que soit le schéma thérapeutique utilisé. Enfin, entre ces deux catégories se place la catégorie « **intermédiaire** » qui prend en compte les situations incertaines dans lesquelles le succès du traitement est imprévisible (52). Dans un contexte épidémiologique, un micro-organisme est défini comme « **sauvage** » ou « **sensible** » pour les espèces n'ayant pas acquis de mécanismes de résistance à l'antibiotique en question. Une souche bactérienne est définie de « **non-sauvage** » ou « **résistante** » vis-à-vis de l'espèce considérée lorsqu'elle a acquis un mécanisme de résistance à l'antibiotique cible.

Ainsi, les concentrations critiques appropriées pour prédire l'efficacité clinique peuvent être différentes de celles utilisées à des fins de contrôle de la résistance. Un isolat peut, par le biais de mutations ou de transfert horizontal de gènes, développer une sensibilité réduite à un antibiotique, mais avec une CMI suffisamment faible pour permettre un succès thérapeutique. Il est donc important de différencier les critères d'interprétation des CMI pour des fins médicales (concentrations critiques cliniques) de ceux qui sont utilisés pour le suivi de la résistance (concentrations critiques épidémiologiques) (3).

Pour un même couple antibiotique/bactérie, différentes **concentrations critiques** sont définies selon le comité d'expert national, européen ou international qui les détermine (tableau 3).

Les plus utilisées sont celles fournies par le « Clinical Laboratory Standards Institute » (**CLSI**) qui publie pour les tests de sensibilité, des méthodes d'essais cliniques approuvées par la « Food Drug Administration » (FDA) aux Etats-Unis. Pour le CLSI, l'harmonisation des tests de sensibilité est basée sur un modèle décrit dans le document M37-A3 (58). Récemment, trois concentrations critiques ont été définies : les concentrations critiques bactériologiques, cliniques et pharmacodynamiques (58). Les concentrations critiques bactériologiques sont établies uniquement sur la base des données des CMI associées à la base de données épidémiologiques provenant de divers réseaux de surveillance. Les concentrations critiques cliniques sont obtenues à partir d'isolats issus d'études cliniques. Enfin, les concentrations critiques pharmacodynamiques sont calculées à partir des

paramètres d'études PK/PD et de simulations de Monte Carlo établies sur la base des concentrations d'antibiotiques physiologiques et de paramètres de sensibilité microbienne comme les CMI. Il est utilisé comme facteur de pondération pour déterminer la valeur seuil à retenir pour établir un schéma posologique (58).

En Europe, l'« European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing » (EUCAST) fédère six comités nationaux européens (France, Allemagne, Pays-Bas, Norvège, Suède et Royaume-Uni) et prévoit des concentrations critiques épidémiologiques, cliniques et une base de données sur la distribution épidémiologique des CMI (86). L'utilisation des valeurs critiques cliniques est recommandée lors d'analyses de routine pour des conseils sur la thérapie chez le patient (116). Les concentrations critiques épidémiologiques sont quant à elles,

conseillées pour des mesures plus sensibles du développement de la résistance comme l'émergence des résistances dans les hôpitaux et l'environnement, permettant ainsi de développer des stratégies pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (10).

En France, la catégorisation clinique des souches suit les recommandations édictées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM) (207). Ce comité détermine des valeurs critiques cliniques selon la distribution des CMI pour des souches d'espèces bactériennes définies, les concentrations humorales et tissulaires obtenues avec les posologies recommandées, la confrontation des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ou encore les variabilités statistiques des méthodes de mesures de CMI utilisées. Plus récemment, des recommandations pour la réalisation des antibiogrammes ont été élaborées dans le cadre du diagnostic vétérinaire. La détermination de ces concentrations critiques est basée sur l'analyse des données issues du réseau de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes (RESAPATH), des données de surveillance en élevage, des données d'études expérimentales réalisées à l'AFSSA et des données fournies par les firmes pharmaceutiques.

A l'heure actuelle, de nombreuses concentrations critiques proposées par le CA-SFM tendent à s'harmoniser avec les valeurs critiques éditées par l'EUCAST. Quelques rares différences subsistent néanmoins du fait de la politique d'usage des antibiotiques propre à la France d'après les recommandations de l'AFSSAPS et des différentes sociétés savantes françaises.

La CMB correspond quant à elle à la plus faible concentration d'antibiotique qui réduit de 99,9% (norme nord-américaine) contre 99,99% (norme européenne) la population bactérienne initiale après 16 à 24h d'incubation (16). C'est donc, comme la CMI, une valeur statique mesurée en point fixe, mais sa détermination ne bénéficie pas de la standardisation mise en œuvre pour celle de la CMI.

Les antibiotiques exercent des effets bactériostatiques ou bactéricides envers les bactéries ciblées. Lorsque l'antibiotique est bactéricide, c'est-à-dire qu'il tue la bactérie, la CMB est très proche de la CMI (ratio CMB/CMI  $\leq 4$ ). C'est le cas des  $\beta$ -lactamines, des aminosides, des fluoroquinolones et de la vancomycine. Lorsqu'il a un effet bactériostatique, l'antibiotique inhibe seulement la croissance de la bactérie, la CMB est alors très supérieure à la CMI ( $4 < \text{CMB/CMI} \leq 32$ ). Les principaux antibactériens concernés sont la tétracycline, le chloramphénicol et l'érythromycine. Lorsque le ratio CMB/CMI devient supérieur à 32, la bactérie est considérée comme tolérante à l'antibiotique, c'est-à-dire que l'effet bactéricide est réduit voire absent pour la souche. La mesure de la CMB peut cependant montrer quelques lacunes de part sa détermination dans des conditions statiques. En effet, le calcul des CMB ne mesure pas l'intensité de la réduction de la population bactérienne et ne prend pas en compte le facteur temps. De même, la détermination très standardisée des CMI *in vitro* présente certaines limites notamment dans l'utilisation de ce test pour des applications *in vivo* souvent très différentes. En effet, les conditions rencontrées au niveau du site d'infection correspondent à un environnement dynamique avec un système immunitaire coopératif, des protéines réduisant la fraction libre, un inoculum de taille variable, des concentrations d'antibiotiques variables. Pourtant, des études expérimentales et cliniques attestent de la corrélation entre la CMI mesurée et les effets observés (64). La CMI est donc considérée comme une bonne approximation de la concentration libre d'antibiotique. C'est la raison pour laquelle les CMI des bactéries extracellulaires sont comparées aux concentrations plasmatiques et que ce critère PD apparaît comme très pertinent pour la construction des indices PK/PD d'efficacité.

### **Etude dynamique : Cinétique de bactéricidie**

Les cinétiques de bactéricidie apportent des informations fondamentales sur la cinétique de l'effet de l'antibiotique sur une souche bactérienne. Cette approche basée sur un dénombrement des bactéries viables au cours du temps et à différentes concentrations

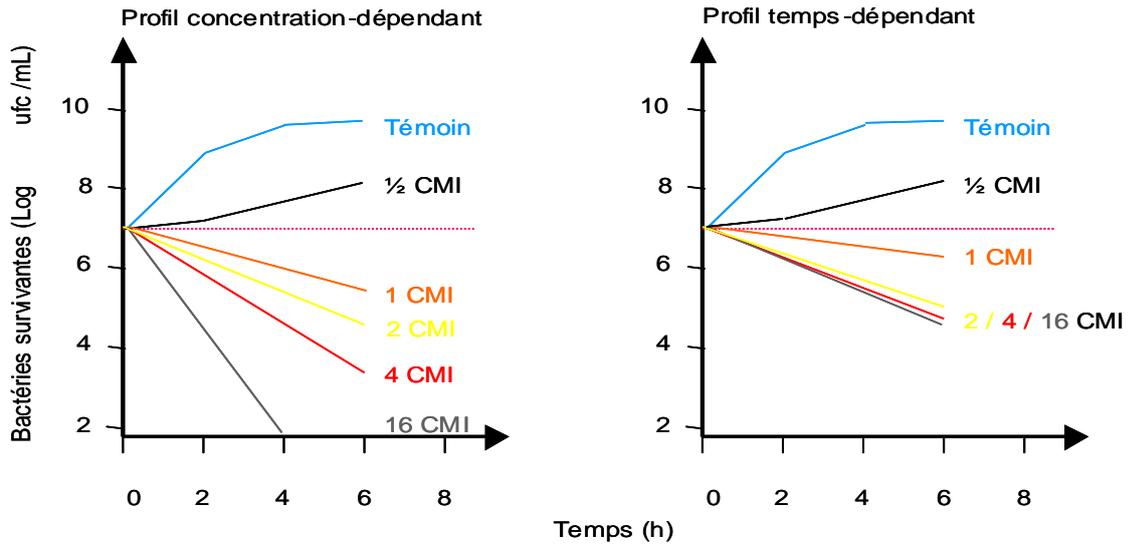


Figure 4. Représentation graphique de cinétiques de bactéricidie : profils de type concentration-dépendant et de type temps-dépendant.

d'antibiotiques permet de caractériser l'évolution de l'activité de l'antibiotique. L'activité bactéricide d'un antibiotique est influencée par deux facteurs, le temps d'action et la concentration d'antibiotique utilisé. Les cinétiques de bactéricidie sont représentées graphiquement avec en abscisse le temps en heure et en ordonnée les unités formants des colonies (UFC) transformées en logarithme ( $\log_{10}$ ). L'inspection visuelle des courbes permet de visualiser deux phases : l'une précoce, l'autre tardive. La phase précoce concerne les 6 à 8 premières heures de la cinétique et permet de définir le niveau de dépendance de l'antibiotique. La phase tardive, au-delà de 6-8 h met en évidence l'éventuelle « recroissance » de la population bactérienne (figure 4).

Pour certains antibiotiques, l'activité bactéricide augmente avec la concentration utilisée, c'est le cas des aminosides qui sont dits concentration-dépendants où l'efficacité de l'antibiotique est liée au pic sérique obtenu. De ce fait viennent les arguments actuels pour administrer des antibiotiques en une dose unique journalière comme les aminosides ou fluoroquinolones (96). Pour d'autres, l'activité bactéricide est maximale dès les premières concentrations bactéricides et si la concentration d'antibiotique est augmentée, la bactéricidie n'est pas modifiée. Ils sont dits temps-dépendants. C'est le temps durant lequel la concentration d'antibiotiques est supérieure à la CMB qui est prépondérant. Ce sont pour l'essentiel les  $\beta$  lactamines dont la bactéricidie lente est relativement indépendante de la concentration, une fois le seuil de vitesse maximale de bactéricidie atteint (4 à 6 fois la CMI), et, à un degré moindre, les glycopeptides. Pour les antibiotiques temps-dépendants, c'est le rythme d'administration qui influence l'efficacité thérapeutique : augmentation du nombre de prises ou perfusion continue (64).

### **Effets post-antibiotiques**

Après une exposition à des concentrations proches de la CMI, une variété d'effets peut être observée comme une altération de la morphologie, de l'adhérence, la production de toxines bactériennes ou encore un délai avant la reprise de la croissance, même si l'antibiotique a été complètement enlevé. La mesure correspondante est appelée l'effet post-antibiotique. Ces effets sont définis comme le temps que met la culture à croître d'un  $\log_{10}$  UFC/ml à partir du moment où la concentration de l'antibiotique est sub-inhibitrice c'est-à-dire en dessous de la CMI. L'effet post-antibiotique s'explique par les mécanismes d'action des antibiotiques et peut être du à la persistance de l'antibiotique à ces sites de fixation, le

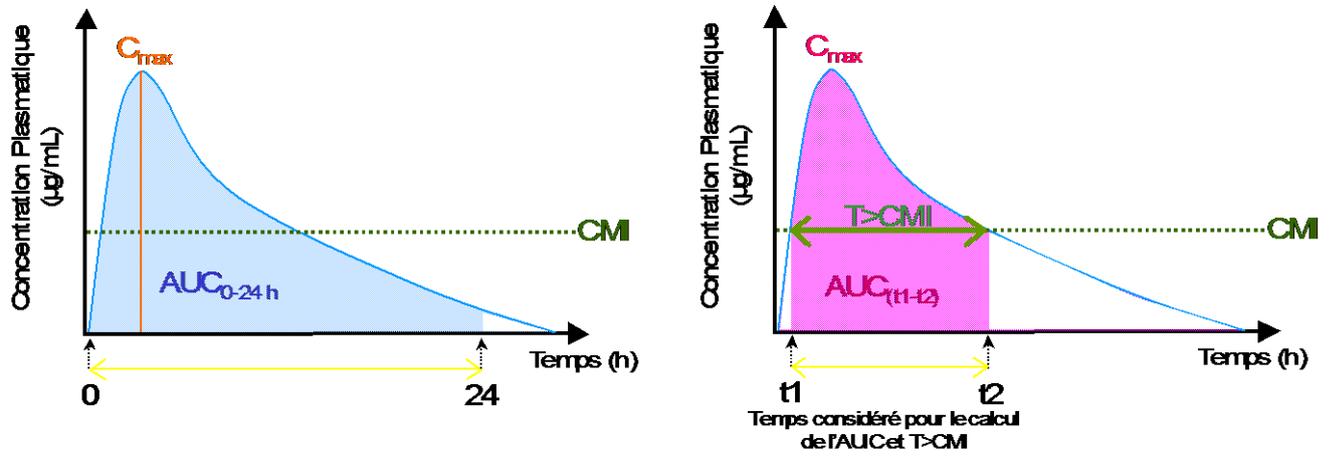


Figure 5. Représentation des principaux critères de substitution d'après Rybak *et al.* (2006).

temps de diffusion en dehors de la bactérie (quinolone), le temps de régénération des enzymes, des ribosomes de la bactérie (aminoglycosides). La durée de cet effet post-antibiotique correspond au délai minimum au bout duquel les bactéries retrouvent une vitesse de croissance normale. La présence ou l'absence d'un effet post-antibiotique sur une bactérie influence son mode de prescription. Ainsi, dans les conditions d'utilisation thérapeutique, les  $\beta$ -lactamines ne produisant pas d'effet antibiotique notable envers les bactéries à Gram négatif et un effet modéré envers les bactéries à Gram positif doivent garder des concentrations au niveau des sites infectés toujours élevées (224). Dans ce cas, la fréquence des administrations, voire la perfusion continue optimise l'action de l'antibiotique. En revanche, pour les aminosides, dont l'effet post-antibiotique est de plusieurs heures, l'intervalle entre deux injections pourra être augmenté. Ce sont ces principes qui prévalent dans l'utilisation actuelle des aminosides en monodose quotidienne (224).

#### I.A.3.c. Paramètres PK/PD et détermination d'un schéma posologique

Lors de la détermination d'un schéma thérapeutique deux éléments sont recherchés : la dose et l'intervalle d'administration. La dose est la résultante de deux paramètres PK fondamentaux que sont la clairance plasmatique et la biodisponibilité et d'un paramètre PD, la concentration plasmatique efficace (101).

$$\text{Dose (par jour)} = \frac{\text{Clairance plasmatique} \times \text{Concentration plasmatique efficace}}{\text{Biodisponibilité}}$$

La concentration plasmatique efficace est classiquement estimée *in vitro* par la mesure de CMI correspondant à la concentration plasmatique libre de l'antibiotique. De ce fait, les principaux paramètres PK/PD utilisés se caractérisent en général par différents aspects du profil des concentrations en fonction du temps rapporté à la CMI : le temps pendant lequel les concentrations sont supérieures à la CMI ( $T > \text{CMI}$ ), l'aire sous la courbe également rapporté à la CMI ( $\text{AUC}/\text{CMI}$ ), l'aire sous la courbe au-dessus de la CMI (AUIC) et le pic de la courbe ( $C_{\text{max}}$ , rapporté ou non à la CMI,  $C_{\text{max}}/\text{CMI}$ ) (figure 5) (101). Lors de l'utilisation de la fraction libre de l'antibiotique les acronymes sont précédés du caractère *f* (*f* AUIC, *f*  $T > \text{CMI}$  et *f*  $C_{\text{max}}/\text{CMI}$ ). De nombreuses études ont été réalisées *in vitro* et sur

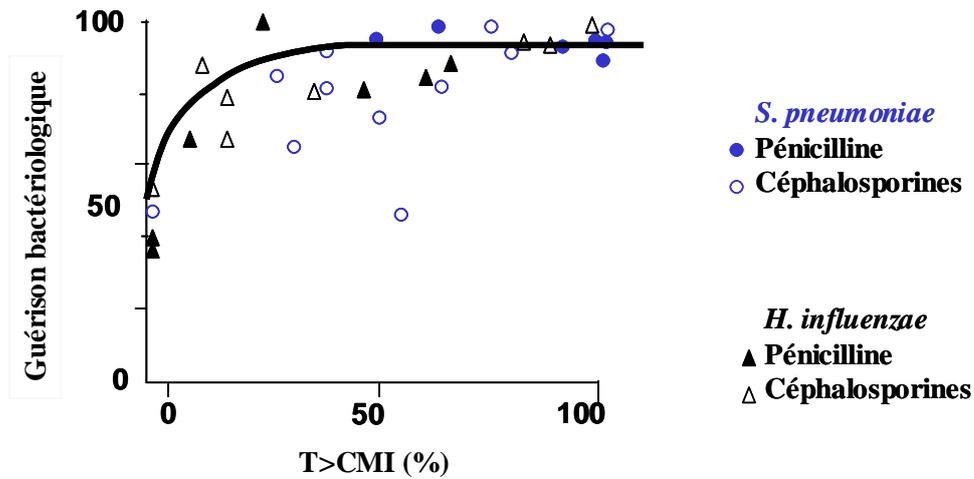


Figure 6. Pharmacodynamie des  $\beta$ -lactamines et des macrolides. Efficacité de l'antibiotique en fonction de l'indice T > CMI d'après Craig *et al.* (1996).

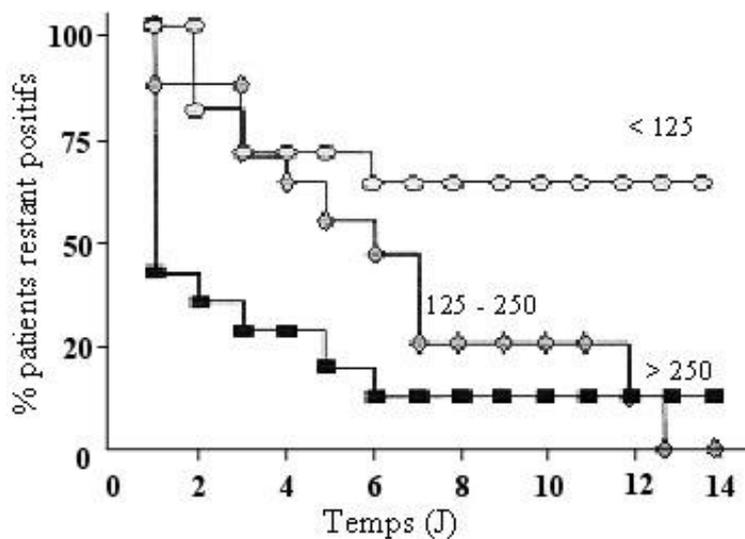


Figure 7. Relation entre AUC/CMI et l'éradication bactérienne chez des patients traités avec de la ciprofloxacine pour une pneumonie nosocomiale d'après Schentag *et al.* (2000).

modèles animaux. Elles convergent toutes vers l'observation que pour les antibiotiques à bactéricidie lente, *i.e.* les antibiotiques temps-dépendants, le paramètre pharmacodynamique prédictif de l'efficacité thérapeutique est le temps pendant lequel les concentrations sériques d'antibiotiques se situent au-dessus de la valeur de la CMI ( $T > CMI$ ) (64). Les modèles animaux s'accordent pour montrer que le  $T > CMI$  doit couvrir au moins 40 % de l'intervalle entre deux administrations successives, mais celui-ci augmente avec la gravité de l'infection (figure 6) (65).

Concernant les antibiotiques concentration-dépendants, le rapport  $C_{max}/CMI$  est le paramètre le plus prédictif de l'efficacité de ces antibiotiques, comme cela a pu être démontré avec les aminoglycosides. Dans le but d'optimiser l'efficacité thérapeutique de ces antibiotiques, ce rapport doit être compris entre 8 et 12 (96). Le second paramètre prédictif de l'efficacité bactériologique ou clinique des antibiotiques dits concentration-dépendant est le rapport AUC/CMI ou AUIC. Les études réalisées chez différents modèles animaux et chez l'homme montrent que la valeur prédictive de ce paramètre est relativement constante quelque soit l'espèce concernée. Cela n'est pas étonnant dans la mesure où la cible pharmacologique, la bactérie, est la même. L'AUIC, comme facteur prédictif du succès bactériologique et/ou clinique a surtout été évaluée avec les fluoroquinolones. Dans les infections à bacilles Gram négatif chez l'animal comme chez l'homme, il apparaît qu'une  $AUIC_{24h}$  supérieure à 125 est prédictive d'un haut niveau de succès bactériologique et clinique (figure 7). Une équation prenant en compte les critères PK et PD a été proposée (221):

$$\text{Dose (par jour)} = \frac{Cl_T \times AUIC \times CMI}{f_u \times F\% \times 24h}$$

avec AUIC (AUC/CMI) le critère d'évaluation cible exprimé en heures, CMI Concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis du pathogène cible,  $Cl_T$  la clairance plasmatique totale par jour,  $f_u$  la fraction libre dans le plasma (de 0 à 1) et  $F\%$  le facteur de biodisponibilité (de 0 à 1).

Les critères PK/PD sont étroitement liés les uns avec les autres. Ainsi pour un temps d'élimination donné de l'antibiotique et un intervalle entre les doses fixé, toute augmentation de la concentration maximale ( $C_{max}$ ) entraînera également une augmentation de l'aire sous la courbe (AUC) et du temps pendant lequel la concentration reste supérieure à la CMI donnée.

Tableau 4. Classification des principales molécules de  $\beta$ -lactamines.

Groupes	Sous-groupes	Principales Molécules
<b>Penicillines</b>	pénicillines	pénicilline G et V <sup>a</sup> , cloxacilline <sup>a</sup> , oxacilline <sup>a</sup>
	aminopénicillines	ampicilline <sup>a,b</sup> , amoxicilline <sup>a,b</sup>
	carboxypénicillines	pipéracilline <sup>a</sup> , ticarcilline <sup>a</sup>
<b>Céphalosporines</b>	première génération (C1G)	Céfalexine <sup>a</sup> , céfalotine <sup>a</sup> , cefalonium <sup>a</sup>
	deuxième génération (C2G)	céfoxitine <sup>a</sup> , céfamandole <sup>a</sup> , céfuroxime <sup>a</sup>
	troisième génération (C3G)	céfotaxime <sup>a</sup> , céfopérazone <sup>a,b</sup> , ceftiofur <sup>b</sup> , cefpodoxime <sup>a</sup> , <b>céfixime</b> <sup>a</sup>
	quatrième génération (C4G)	céfépime <sup>a</sup> , céfpirome <sup>a</sup>
<b>Carbapénèmes</b>		imipénème <sup>a</sup> , ertapénème <sup>a</sup>
<b>Monobactames</b>		aztréonam <sup>a</sup>

<sup>a</sup> molécule utilisée en médecine humaine ; <sup>b</sup> molécule utilisée en médecine vétérinaire

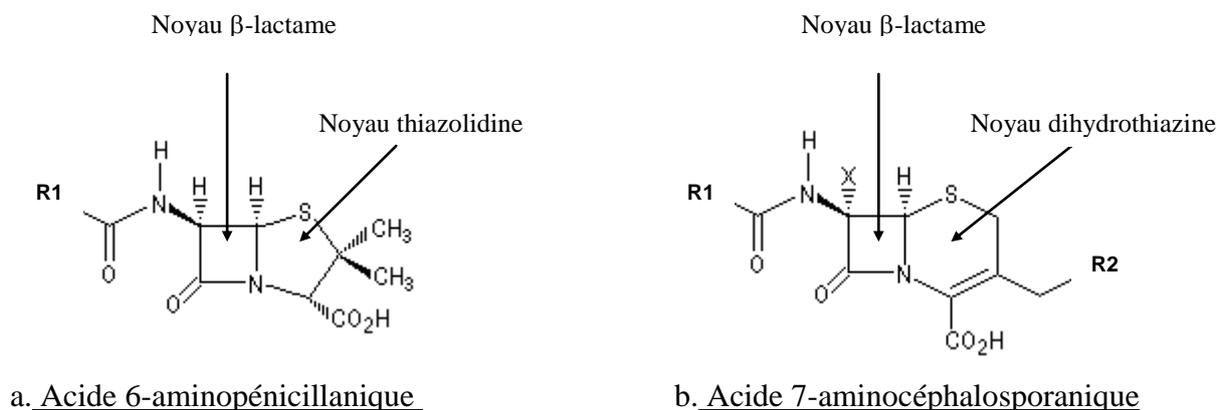


Figure 8. Structure chimique de base des pénicillines (a) et des céphalosporines (b).

## I.B. Les $\beta$ -lactamines

La pénicilline, un antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactamines a été découverte en 1928 par le médecin anglais A. Fleming à partir de souches du champignon microscopique *Penicillium notatum*. Ce n'est qu'en 1940 que deux biochimistes H. W. Florey et E. B. Chain réussirent à l'isoler et à la purifier. La pénicilline G sous forme intraveineuse fut introduite en thérapeutique pour la première fois en 1942, quatorze ans après sa découverte. Rapidement, la pénicilline V, l'équivalent de la pénicilline G sous forme orale, fut extraite et apparurent successivement les  $\beta$ -lactamines d'hémisynthèse élaborées à partir des microorganismes du genre *Penicillium* pour les pénicillines et du genre *Cephalosporium* pour les céphalosporines initialement isolées en 1948. A l'heure actuelle, les  $\beta$ -lactamines sont largement utilisées et demeurent la famille d'antibiotiques la plus diversifiée et la moins toxique. Cette famille d'antibiotiques est répartie en quatre principaux groupes : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (tableau 4).

### I.B.1. Structure et propriétés des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines se caractérisent par la présence d'un élément structural commun, l'azétidine-2-one ou noyau  $\beta$ -lactame. La structure de base des **pénicillines**, l'acide 6-aminopénicillanique, est constituée d'un cycle thiazolidine lié au cycle  $\beta$ -lactame. Le noyau  $\beta$ -lactame peut être substitué par acylation sur la fonction aminée pour donner naissance à des dérivés qui se différencient par leur stabilité, leur pharmacocinétique, leur spectre d'activité et leur résistance aux  $\beta$ -lactamases (figure 8). Par ailleurs, la fonction carboxylique peut être transformée en carboxylate et rendre la molécule plus soluble ou permettre l'obtention d'esters comme les prodrogues. Cette fonction acide est toutefois essentielle à l'activité antibactérienne.

**Les céphalosporines** se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (noyau « céphème ») avec un atome de soufre en position 1 (figure 8). Leur noyau céphème est beaucoup plus stable que le noyau pénam des pénicillines, ce qui permet aux céphalosporines de mieux résister globalement à l'action diverse des  $\beta$ -lactamases bactériennes. La structure générale des céphalosporines se

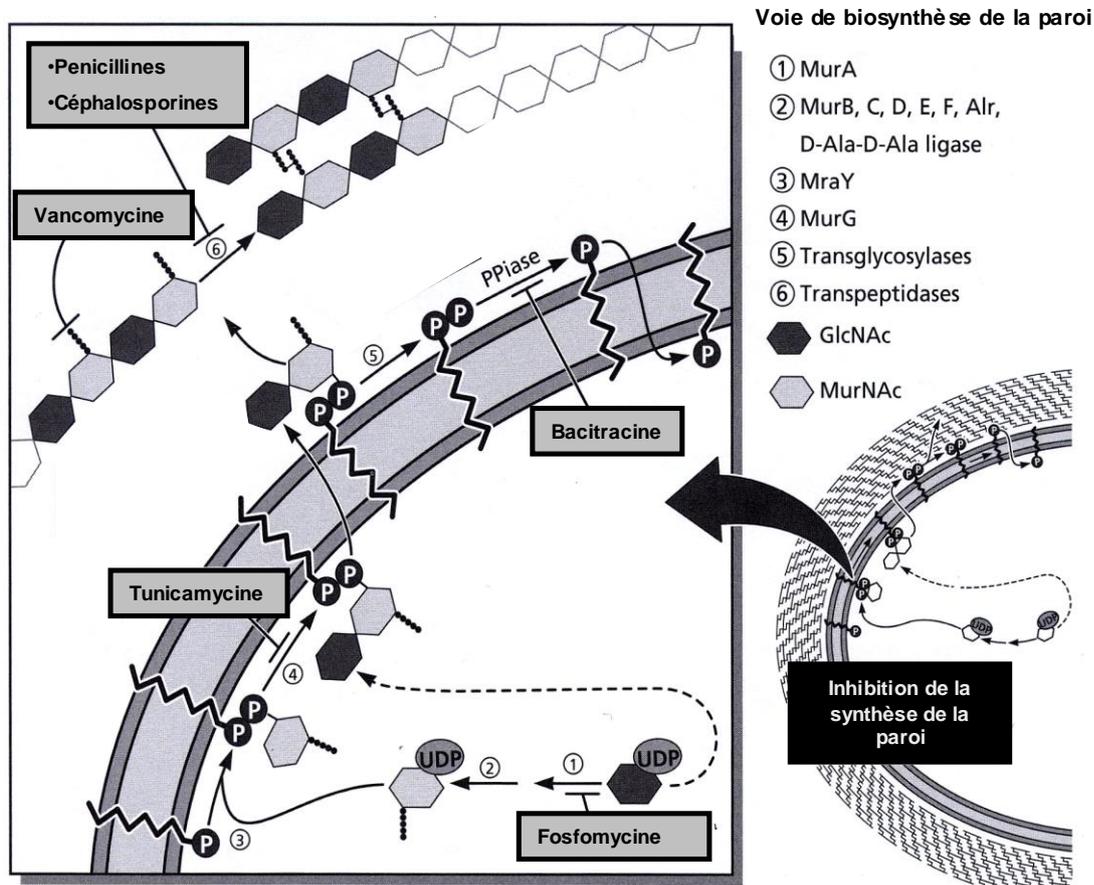


Figure 9 : Mode d'action des antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi d'après Walsh *et al.* (2003).

compose donc d'une partie commune à tous les membres du groupe, l'acide 7-aminocéphalosporinique, d'une chaîne latérale variable R1 reliée au reste de la molécule par une fonction amide et d'un groupement R2 (figure 8). En règle générale, les substitutions en position 7 (R1) influencent l'activité antibactérienne des céphalosporines en modifiant leur affinité pour les protéines liant la pénicilline (PLPs) et/ou leur stabilité à l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases. Les modifications en position 3 (R2) influencent les propriétés antibactériennes et pharmacocinétiques alors que l'ajout d'un groupement ester au groupement carboxylique, en position 4, permettra d'augmenter la biodisponibilité des céphalosporines orales.

**Les carbapénèmes et les monobactames** sont, quant à eux, des dérivés proches des céphalosporines.

### I.B.2. Mode d'action des $\beta$ -lactamines : Inhibition de la synthèse de la paroi

Les bactéries possèdent à l'extérieur de leur membrane plasmique un polymère réticulé, le peptidoglycane ou muréine. Cette structure totalement absente chez les eucaryotes, participe au maintien de la forme de la cellule bactérienne et protège la membrane cytoplasmique des variations de la pression osmotique. Le peptidoglycane est une structure vitale pour la bactérie et rares sont celles qui n'en possèdent pas. De ce fait, la synthèse et l'assemblage du peptidoglycane, apparaissent comme des cibles privilégiées des antibiotiques (figure 9).

Le peptidoglycane est un polymère formé de molécules de N-acétyl-D glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique sur lesquelles se fixe une chaîne peptidique comportant cinq acides aminés qui sont la L-alanine, l'acide D-glutamique, la L-lysine et deux D-alanine. Sur la lysine se fixe la pentaglycine. La synthèse du peptidoglycane est complexe et nécessite l'activité d'environ trente enzymes différentes dont les plus importantes sont les transpeptidases, les transglycosidases et les carboxipeptidases. Elle comporte trois étapes principales : **Une étape intracytoplasmique** aboutissant à la synthèse d'UDP-acétylmuramyl-pentapeptide, terminé par un dipeptide, le D-alanyl-D-alanine. La synthèse de ce dipeptide nécessite l'intervention de la phosphoénolpyruvate transférase, d'une racémase et d'une synthétase. **Une deuxième étape membranaire** aboutissant à la formation d'un polymère acétylglucosamine et de l'UDP-acétylmuramyl-dipeptide. Ce polymère sort du cytoplasme à travers la membrane cytoplasmique. Enfin, **une troisième étape**

**extracytoplasmique** comportant une polymérisation par transpeptidation (liaison peptidique entre acides aminés) sous l'effet d'une transpeptidase fixée à la partie externe de la membrane cytoplasmique et par transglycosylation (liaison glucidique) (204, 231).

Plus de 70 ans après leur découverte, le mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines n'est pas encore totalement élucidé. D'un point de vue stéréochimique, les  $\beta$ -lactamines sont des analogues de la terminaison D-alanine-D-alanine des précurseurs de la synthèse du peptidoglycane. Par leur ressemblance avec ces précurseurs, les  $\beta$ -lactamines se fixent par liaison covalente aux PLPs. Ces PLPs sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane comme les transpeptidases, les carboxypeptidases et transglycosylases. Le nombre de PLPs varie selon l'espèce bactérienne. Pour *E. coli*, il existe dix PLPs classées en fonction de leur poids moléculaire et numérotées de 1 à 7. Les PLPs 1a, 1b, 1c, 2 et 3 de haut poids moléculaire sont des transglycosylases/D-alanyl-D-alanine transpeptidase essentielles à la survie de la bactérie et interviennent notamment dans l'élongation cellulaire (PLP1a, 1b et 1c), la forme de la cellule (PLP2) et la formation du septum de la division cellulaire (PLP3) (209). Les PLPs de bas poids moléculaire 4, 5, 6, 6b et 7 assurent le remaniement des chaînes polysaccharidiques mais ne sont pas indispensables à la vitalité de la bactérie. Par liaison aux pénicillines, les enzymes PLPs sont bloquées pendant plusieurs heures ce qui entraîne un affaiblissement du peptidoglycane et une lyse osmotique de la bactérie. L'action des  $\beta$ -lactamines sur les PLPs varie en fonction des concentrations d'antibiotiques. A titre d'exemple, des céphalosporines comme le céfotaxime ou la ceftazidime, qui ont une forte affinité pour la PLP3, vont l'inhiber à de faibles concentrations et provoquer une filamentation bactérienne, alors que, à de plus fortes concentrations, elles vont également inhiber les PLP1a et 1b, et provoquer l'apparition de sphéroplastes et une lyse rapide (209). Des études plus récentes ont également montré que la lyse bactérienne était dépendante d'enzymes responsables de la dégradation naturelle du peptidoglycane, les autolysines et les hydrolases. Les  $\beta$ -lactamines activeraient des protéines bactériennes appelées des holines et inactiveraient également des inhibiteurs endogènes des hydrolases et autolysines bactériennes. Le système de régulation des enzymes lytiques alors perturbé, les holines formeraient activement des canaux transmembranaires, permettant ainsi des fuites membranaires, le passage des hydrolases du peptidoglycane et la lyse de la bactérie (25).

Figure 10. Représentation schématique des spectres d'activité des différentes céphalosporines.

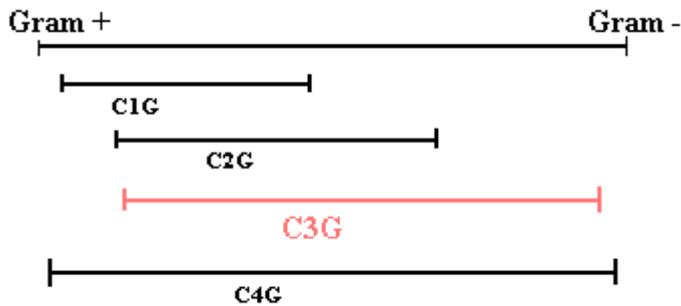


Tableau 5. Les céphalosporines de troisième génération commercialisées.

Dénomination	Nom déposé vétérinaire	Nom déposé humain	Principe actif
<b>ceftiofur</b>	Naxcel <sup>®</sup> (iv, im) Excenel <sup>®</sup> (im, sc)	-	desfuroyl-ceftiofur
<b>céfopérazone</b>	Pathozone <sup>®</sup> (pi)	Céfobis <sup>®</sup> (iv, im)	T1551-D
<b>céfotaxime</b>	-	Claforan <sup>®</sup> (iv, im)	désacetyl céfotaxime
<b>ceftriaxone</b>	-	Rocéphine <sup>®</sup> (iv, im, sc)	ceftriaxone
<b>ceftazidime</b>	-	Fortum <sup>®</sup> (iv, im)	ceftazidime
<b>céfixime</b>	-	Oroken <sup>®</sup> (po)	céfixime
<b>céfotiam hexétil</b>	-	Taketiam <sup>®</sup> (po) Texodil <sup>®</sup> (po)	céfotiam
<b>cefpodoxime proxetil</b>	-	Orelox <sup>®</sup> (po)	cefpodoxime

Administration par voie: im : intramusculaire; iv : intraveineuse ; po : *per os*, sc : sous-cutanée. pi : pommade intramammaire.

### I.B.3. Spectre d'activité des $\beta$ -lactamines

L'ensemble des bactéries affectées par un antibiotique donné est appelé le spectre d'activité de cet antibiotique. Les antibiotiques efficaces contre de nombreuses bactéries à Gram positif et/ou négatif sont dits à « large spectre » tandis que ceux qui sont actifs uniquement contre certaines bactéries sont dits à « spectre étroit ». L'activité des pénicillines diffère de celle des céphalosporines de différentes manières. **La pénicilline G** est active contre les gonocoques, les méningocoques et quelques bactéries à Gram positif telles que les streptocoques et les staphylocoques. Parmi les pénicillines à large spectre, l'ampicilline étend son spectre d'activité à de nombreux bacilles à Gram négatif non naturellement producteurs de  $\beta$ -lactamases constitutives telles que *Shigella* spp et *Salmonella enterica*.

Les carboxypénicillines (ticarcilline, carbénicilline) présentent un spectre encore plus étendu sur les bacilles à Gram négatif incluant *Pseudomonas aeruginosa* et des entérobactéries naturellement productrices de  $\beta$ -lactamases constitutives chromosomiques comme *Enterobacter* spp., *Serratia* spp, *Citrobacter freundii* (53).

Actuellement, il existe quatre générations de **céphalosporines** classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité (figure 10). Les céphalosporines de première génération (**C1G**) comme la céfaléxine et la céfalotine, sont essentiellement efficaces contre les bactéries pathogènes Gram positif comme *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinases inductibles comme *E. coli* et *Salmonella* spp. Les céphalosporines de seconde génération (**C2G**) telles que le céfamandole et le céfoxitine (céfamycine apparentée aux C2G), sont caractérisées par une meilleure résistance aux  $\beta$ -lactamases à large spectre et un spectre d'action plus étendu au sein des entérobactéries, avec des variations selon les molécules. Les céphalosporines de troisième génération (**C3G**) se distinguent par un accroissement important de leur spectre antibactérien et par leur stabilité à la plupart des  $\beta$ -lactamases comme les pénicillinases et les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Les principales C3G commercialisées sont présentées dans le tableau 5. Les céphalosporines de quatrième génération (**C4G**) (céfépime, cefpirome) sont à large spectre et présentent un gain d'activité sur les cocci à Gram positif, une activité sur *P. aeruginosa* et une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporinases hyperproduites. Elles sont une substitution possible aux céphalosporines de troisième

génération pour le traitement de germes résistants. Actuellement en cours de développement (phase clinique), le ceftopibrole est une nouvelle céphalosporine (prochaine représentante des céphalosporines de cinquième génération (**C5G**) dont le large spectre d'activité inclut les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Parmi les bactéries à Gram positif, le spectre d'activité couvre *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative résistants à la méticilline, *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline et *Enterococcus faecalis*. Parmi les bactéries à Gram négatif, le ceftopibrole est actif sur les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. A l'inverse, le ceftopibrole est soit inactif soit peu actif sur *Enterococcus faecium*, les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, *A. baumannii* et les anaérobies comme *Bacteroides fragilis* (149).

**L'imipénème** est un carbapénème à spectre large actif contre les pneumocoques, *Haemophilus influenza* et les Gram négatifs y compris *Pseudomonas aeruginosa*. Il est associé à la cilastatine, qui est un inhibiteur de l'enzyme rénale déhydropeptidase I qui métabolise et inactive l'imipénème. Plus récemment, **l'ertapénème** a été introduit sur le marché. Son spectre d'activité comprend les bactéries aérobies et anaérobies connues pour être sensibles ou possiblement sensibles à l'antibiotique. C'est le cas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*, *Haemophilus influenza*, *Clostridium*, *Bacteroides fragilis*. L'ertapénème est généralement actif contre les entérobactéries produisant des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE). La résistance peut cependant être observée lorsque les BLSE ou d'autres  $\beta$ -lactamases très actives sont associées à une perméabilité réduite de la membrane externe des souches bactériennes (230).

#### I.B.4. Propriétés pharmacocinétiques des $\beta$ -lactamines chez l'homme

##### L'absorption

**La pénicilline G** et les **carboxypénicillines** sont administrées par voie parentérale car la pénicilline G est détruite par l'acidité gastrique et les autres dérivés ne sont pas réabsorbés. **La pénicilline V** est plus résistante à l'acide et peut être prise par voie orale.

**Les céphalosporines** sont stables en milieu acide mais sont pour la plupart mal absorbées dans le tube digestif. Elles sont dès lors administrées par voie parentérale.

Tableau 6. Paramètres pharmacocinétiques du céfixime après administration chez l'homme et chez le rat.

<i>Homme</i>	<i>Guay et al. 1986</i>	<i>Faulkner et al. 1988</i>	<i>Faulkner et al. 1988</i>	<i>Duverne et al. 1992</i>	<i>Westphal et al. 1993</i>		
Dose (mg)	400	200	200	200	200		
Voie d'administration	PO	IV	PO	PO	IV		
$C_{max}$ (mg/l)	4.92±0.51	-	3.22	3.88±1.3	2.3±0.9	-	2.5±0.4
$T_{max}$ (mg/l)	4.9±0.6	-	-	3.7±0.9	5.1±2.6	-	3.7±0.7
AUC <sub>0-∞</sub> (mg.h/l)	40±0.3	47.0	26	28.2±10.1	20.1±7.8	53.5±8.0	18.2±3.8
$t_{1/2}$ élimination (h)	3.15±0.15	3.2	3.5	3.2±0.5	3.45±0.7	3.25±0.4	3.35±0.4
F (%)	-	-	52.3	-	-	-	31.5±6.3
Cl <sub>T</sub> (l/h)	-	-	-	2.58±0.48	3.25±1.5	3.5±0.4	-

<i>Rat</i>	<i>Sakamoto et al. 1985</i>	<i>Sakamoto et al. 1988</i>	
Dose (mg/kg)	100	100	20
Voie d'administration	IV	PO	PO
$C_{max}$ (mg/l)	-	32	8
$T_{max}$ (mg/l)	-	1.96	1.18
AUC <sub>0-∞</sub> (mg.h/l)	510	192	30.8
$t_{1/2}$ élimination (h)	1.68	2.29	2.1
F (%)		38	

$C_{max}$  : concentration plasmatique maximale,  $T_{max}$  : temps d'occurrence de la concentration plasmatique maximale, AUC<sub>0-∞</sub> : aire sous la courbe du temps 0 à l'infini,  $t_{1/2}$  élimination temps de demi-vie d'élimination, Cl<sub>T</sub> : clairance,  $F$  : biodisponibilité absolue.

Pour **les céphalosporines orales**, la biodisponibilité est de 50 à 90 %. **Le céfixime**, la première céphalosporine orale de troisième génération, possède des propriétés pharmacocinétiques particulières récapitulées dans le tableau 6 (21, 88, 89). Son absorption incomplète avec une biodisponibilité par voie orale de 30 à 50 % est en partie liée à un mécanisme de transport actif au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle, saturable à dose élevée. Dans le cas d'une prise d'aliments, le pic plasmatique est retardé mais non réduit. Certaines céphalosporines comme le cefpodoxime sont également disponibles sous la forme d'une prodrogue estérifiée, libérant l'antibiotique dans la circulation après clivage enzymatique (144).

### **La distribution**

**Les pénicillines** diffusent facilement dans les espaces extracellulaires mais ne se concentrent pas dans les tissus. Elles pénètrent en faible quantité dans la moelle osseuse, le placenta et le liquide céphalorachidien. Elles passent toutefois mieux la barrière hématoencéphalique en cas d'inflammation des méninges. A l'exception des aminopénicillines, les pénicillines sont liées aux protéines plasmatiques à 50% minimum, mais ceci n'a guère de conséquences cliniques. Comme les pénicillines, **les céphalosporines** diffusent mais ne se concentrent pas dans les tissus.

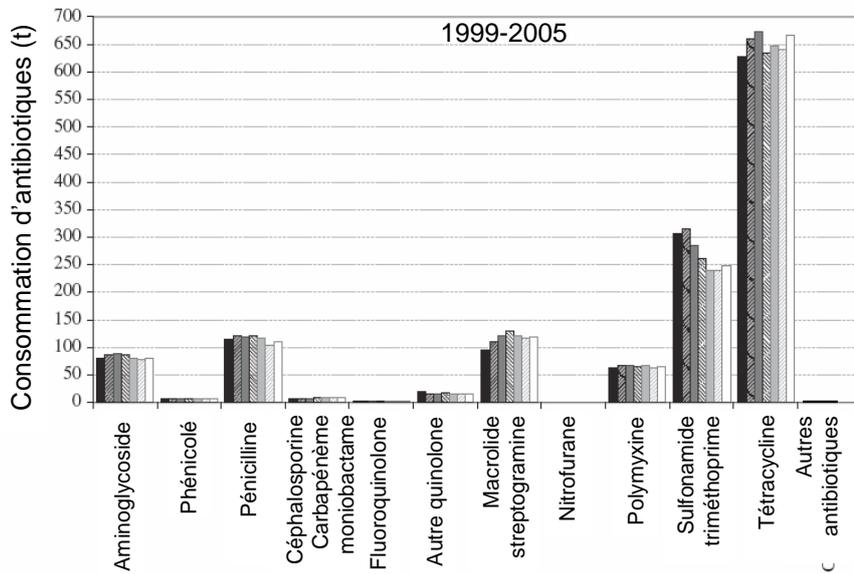
### **La métabolisation**

La presque totalité **des pénicillines** est faiblement métabolisée (< 25 %), elles sont éliminées en grande majorité sous forme active. Concernant **les céphalosporines**, la biotransformation métabolique est très réduite avec moins de 10% de produit actif métabolisé. Cependant, dans le cas des céphalosporines acétylées comme la céphalotine et le céfotaxime, l'ester acétique est hydrolysé par des hydrolases.

### **L'excrétion**

L'excrétion **des pénicillines** s'opère au niveau rénal par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire à l'exception de la nafcilline et de l'apalcilline éliminées principalement par une

a.



b.

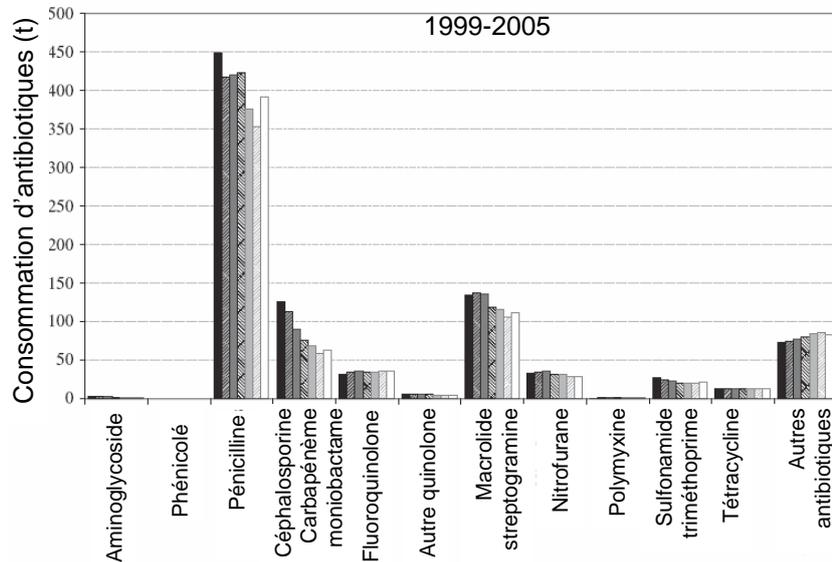


Figure 11. Répartition des ventes d'antibiotiques (en tonnes) entre 1999 et 2005 en France par familles d'antibiotiques utilisées en médecine vétérinaire (a) ou en médecine humaine (b) d'après Moulin *et al.* (2008).

métabolisation hépatique. Leur demi-vie d'élimination est généralement courte, de l'ordre de 0,5 à 2h. L'élimination **des céphalosporines** est également rapide ( $t_{1/2}$  de 1 à 2 heures), à l'exception notable de la ceftriaxone qui possède une demi-vie nettement plus longue (6-8 heures) permettant des prises plus espacées. Cette propriété est due à une forte liaison aux protéines et à une mauvaise reconnaissance par le transporteur des acides organiques au niveau des tubules rénaux. L'excrétion des céphalosporines s'opère principalement par voie rénale, par voie biliaire et/ou par métabolisation hépatique (204, 231). L'élimination du céfixime se caractérise par une demi-vie comprise entre 3 et 4h. Entre 15-20 % du produit est éliminé principalement par voie rénale et 25 % par voie biliaire. Aucun métabolite, sérique ou urinaire, n'a pu être mis en évidence chez l'animal comme chez l'homme (90).

#### I.B.5. Utilisation en médecine humaine et vétérinaire

Depuis leur apparition, les  $\beta$ -lactamines sont des antibiotiques de premier choix pour les angines à streptocoques chez l'homme. En 2005, les pénicillines représentent 51 % des ventes d'antibiotiques en médecine humaine en France (figure 11) (160). Cependant 1 à 5% des patients y sont allergiques. De ce fait, les céphalosporines ayant une structure identique aux pénicillines et un spectre plus large, sont souvent une alternative aux patients souffrant d'allergies aux pénicillines. Les C1G constituent un premier choix dans la prophylaxie chirurgicale. Les C2G sont utilisées dans un grand nombre d'infections, notamment respiratoires, urinaires, ostéoarticulaires (53). Les C3G et C4G sont indiquées dans le traitement d'infections sévères à Gram négatif, y compris *Pseudomonas*. Dans le cas d'infections à salmonelles, les C3G comme la ceftriaxone, sont des molécules de premier choix chez les enfants pour lesquels les fluoroquinolones arthrotoxiques ne peuvent être prescrites. Parmi les C3G, le céfixime est limité selon les recommandations de l'AFSSAPS aux infections dues aux germes définis comme sensibles notamment lors d'infections bactériennes des bronchites aiguës, de pneumopathies, de sinusites et d'otites aiguës, de pyélonéphrites, d'infections urinaires hautes ou basses et d'urétrites gonococciques. Le céfixime a également montré son efficacité lors d'infection à *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (154).

Dans le but de limiter la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques utilisés en médecine humaine, les céphalosporines ne représentent qu'une faible proportion des

antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. En effet, les  $\beta$ -lactamines représentent 8 % des ventes d'antibiotiques à usage vétérinaire avec seulement 0,64 % de céphalosporines dont une grande majorité est destinée aux animaux de compagnie (figure 11) (160). Les C3G et C4G utilisées en médecine vétérinaire sont le céfopérazone, la céfovécine, la ceftriaxone, le ceftiofur et la cefquinome. Ces molécules administrées principalement par voie intraveineuse ou par voie cutanée en pommade intra-mammaire sont préconisées pour le traitement chez les bovins des mammites subcliniques et pour la prévention de nouvelles infections à streptocoques et staphylocoques durant la période sèche (1). Le ceftiofur, sous forme injectable est préconisé lors d'infections respiratoires à *Pasteurella* ou *Streptococcus*. Il est utilisé pour traiter les bovins, les porcins, les ovins, les caprins et les chevaux (215). Récemment, l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) a publié de nouvelles recommandations sur l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire ainsi qu'une liste des antibiotiques dits « critiques » (68). Parmi eux, les céphalosporines et les pénicillines ont été déclarées comme des antibiotiques à risque dont l'utilisation présentait une menace pour la santé animale mais également un impact sur l'émergence de la résistance aux antibiotiques en santé humaine (68).

## **II. LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES**

Suite à la suspicion ou au diagnostic d'une infection bactérienne, les professionnels de santé mettent en place les traitements antibiotiques appropriés destinés à l'éradication du germe infectieux. Dans certains cas, les individus sont traités par prévention lorsqu'il existe un facteur de risque d'infection bactérienne (prophylaxie) ou dès l'apparition des premiers signes cliniques (métaphylaxie). Cependant l'utilisation répétée et souvent abusive des antibiotiques tant chez l'homme que chez l'animal favorise l'émergence et la sélection de bactéries résistantes fréquemment associées aux échecs thérapeutiques (134). En effet, en réponse à la pression de sélection des antibiotiques, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes de résistance à ces molécules. Si ces moyens de défense sont exprimés à l'état naturel chez toutes les bactéries d'une espèce, il s'agit de résistance naturelle. S'ils sont portés uniquement par certaines bactéries de l'espèce, la résistance est dite acquise.

### **II.A. Définitions de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

« La résistance n'est pas un phénomène conjoncturel ou passager mais une propriété intrinsèque du monde bactérien » (61). La définition de la résistance aux antibiotiques est encore à l'heure actuelle sujette à de nombreuses discussions. Ainsi, la résistance aux antibiotiques est définie selon différents points de vue (15) :

- Selon le clinicien, une souche est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace.
- Pour le pharmacologue, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si les concentrations atteintes au site d'action sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI).
- Du point de vue du microbiologiste, les bactéries sont dites résistantes si elles disposent d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la CMI.
- Concernant l'épidémiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si sa CMI est significativement différente de celle de la population normale.

Devant cette ambivalence des définitions de la résistance, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé deux définitions de la résistance. La première stipule qu'une souche est dite « résistante » quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus

Tableau 7. Exemples de résistances naturelles aux  $\beta$ - lactamines chez différentes espèces de bacilles aérobies non exigeants à Gram négatif d'après Cavallo *et al.*,(2004).

Espèces	PEN	OXA	AM	AMC	TIC	TCC	PIP	C1G	FOX	CTT	MA	CXM	CTX	CAZ	IPM
<b>Entérobactéries</b>															
<i>Escherichia coli</i>	R	R													
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R													
<i>Shigella spp.</i>	R	R													
<i>Salmonella spp.</i>	R	R													
<i>Klebsiella spp.</i>	R	R	R		R										
<i>Citrobacter koseri</i>	R	R	R		R										
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R				R			R	R			
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	R					R				R			
<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R				R				R			
<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R	R				R							
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R			R	R		R	R			
<b>Bacilles à Gram négatif non fermentaires</b>															
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R	R		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R		R
<i>Burkholderia cepacia</i>	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R			R
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R	R		
<i>Flavobacterium</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Meningosepticum</i>															
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

R : résistance naturelle ; PEN : pénicilline G ; OXA : oxacilline ; AM : aminopénicillines ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : ticarcilline ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; PIP: pipéracilline ; C1G : céphalosporines de première génération ; FOX : céfoxitine ; CTT : céfotétan ; MA : céfamandole ; CXM : céfuroxime ; CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; IPM : impénème.

élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce. La deuxième définition, basée sur des critères pharmacologiques et cliniques, définit une souche résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est plus élevée que la concentration qu'il est possible d'atteindre *in vivo*.

## II.B. Résistance naturelle, acquise, croisée et co-résistance

**La résistance naturelle ou résistance intrinsèque** est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce. Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les  $\beta$ -lactamines inactives vis à vis de ces bactéries. Des exemples de résistances naturelles aux  $\beta$ -lactamines chez différentes espèces de bacilles aérobies sont présentés dans le tableau 7.

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un antibiotique. Dans ce cas, **la résistance acquise** est présente seulement dans certaines souches de l'espèce. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation (57) ou d'une acquisition de matériel génétique étranger (69).

Les résistances mutationnelles sont chromosomiques, spontanées, rares (fréquence de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ ), stables et transmissibles uniquement de façon verticale. L'antibiotique n'est pas l'agent mutagène, il sélectionne seulement les mutants devenus résistants. Elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotique à la fois.

Les résistances par acquisition d'ADN sont la conséquence d'un transfert horizontal y compris entre espèces éloignées phylogénétiquement. Les gènes de résistance aux antibiotiques, pour la plupart chromosomiques, proviennent généralement de micro-organismes producteurs d'antibiotiques pour lesquels ils sont immunisés. Le transfert de ces gènes sera rendu plus efficace après leur intégration sur des éléments mobiles tels que les plasmides, les transposons, les intégrons ou encore sur des phages (196, 197). Ces mécanismes de résistance peuvent alors diffuser très rapidement dans une population (138).

**La résistance croisée** correspond à un seul mécanisme de résistance et entraîne la résistance à tous les antibiotiques d'une même famille. Parmi les nombreux cas de résistances

croisées, des mutations dans les topoisomérases type II, gyrase ou topoisomérases IV induisent la résistance à l'ensemble des fluoroquinolones. Un autre exemple de résistance croisée est celui de la résistance à la méticilline des staphylocoques par la production d'une nouvelle PLP2a qui procure également la résistance aux autres molécules de la famille des  $\beta$ -lactamines. La conséquence majeure de la résistance croisée est la sélection croisée. Dans **la co-résistance**, plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun des mécanismes confère par résistance croisée la résistance à un groupe d'antibiotique conférant à la bactérie un large spectre de résistance (208).

## II.C. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines non enzymatiques

### II.C.1. Diminution de la perméabilité

**La perméabilité** de la membrane externe des bactéries à Gram négatif dépend principalement du lipopolysaccharide (LPS) et des porines ancrées dans cette membrane. Le LPS est très compacte en profondeur grâce à ses acides gras insaturés et formés de structures hydrophiles grâce à ses charges électriques de surface. Cette organisation explique une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée comme la pénicilline G, les macrolides et les glycopeptides.

La pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. Ainsi, la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (121). Chez *E. coli*, deux porines principales sont présentes : OmpF et OmpC. Selon des études de mutants *E. coli* déficients en OmpC, la porine OmpF, suffisamment large, permettrait d'assurer à elle seule la pénétration des  $\beta$ -lactamines. Au contraire, une déficience en OmpF permettrait d'augmenter les CMI des différentes  $\beta$ -lactamines pour les molécules les plus volumineuses, la porine OmpC étant plus étroite. Les mutants de porines ont également été décrits en pratique clinique chez diverses espèces bactériennes. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la

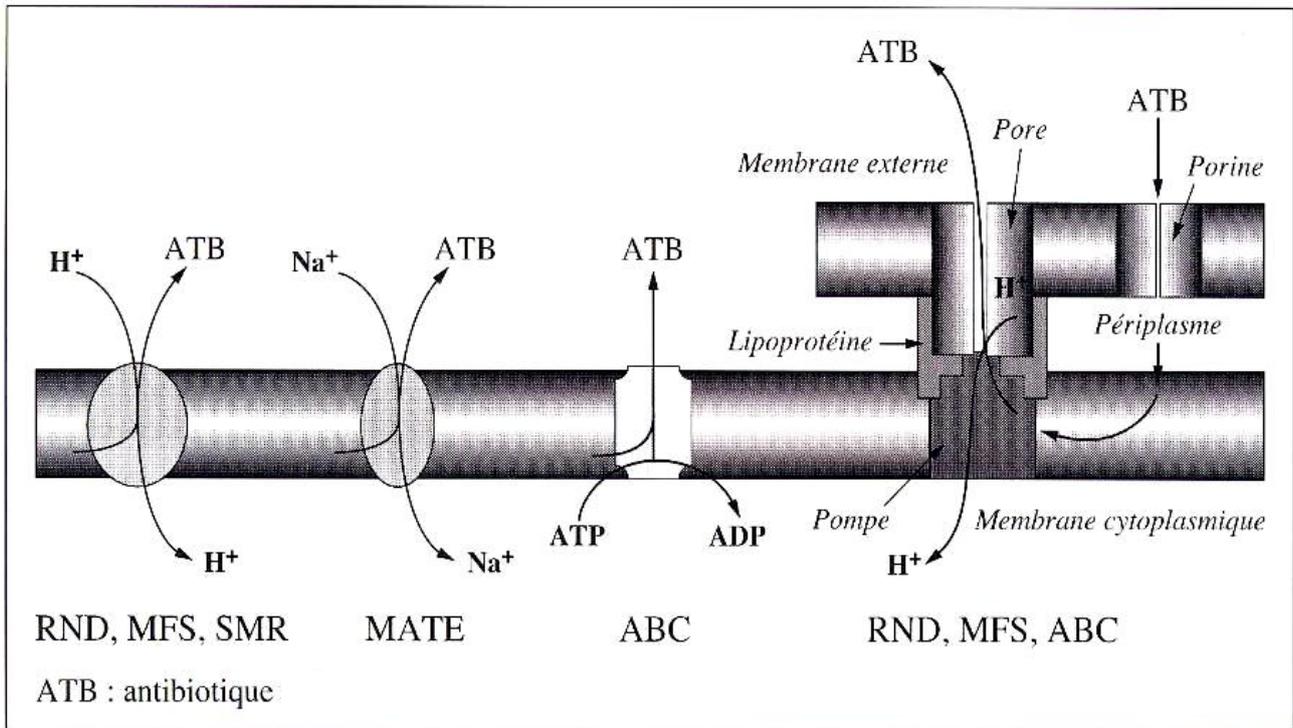


Figure 12. Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux d'après Cattoir *et al.* (2004) : MFS ou *major facilitator superfamily* (ex. NorA chez *Staphylococcus aureus*) ; SMR ou *small multidrug resistance* (ex. EmrE chez *Escherichia coli*) ; MATE ou *multidrug and toxic compound extrusion* (ex. NorM chez *Vibrio parahaemolyticus*) ; RND ou *resistance-nodulation cell division* (ex. MexB chez *Pseudomonas aeruginosa*) avec MexA (*membrane fusion protein*) et OprM (*outer membrane factor*) ; ABC ou *ATP-binding cassette* (ex. LmrA chez *Lactococcus lactis*). ME, EP : membrane externe et espace périplasmique des bactéries à Gram négatif ; MC : membrane cytoplasmique ; ATB : antibiotique.

diminution de perméabilité s'expliquerait par la perte de la porine OprD responsable du transport de l'imipénème (168). Lors de traitement en monothérapie, la sélection de mutants déficients en OprD surviendrait chez 15 à 20 % des patients traités. La résistance  $\beta$ -lactamines par diminution de la perméabilité s'exprime habituellement à bas niveau. Dans certains cas, elle peut être associée à d'autres mécanismes de résistance comme l'efflux ou la production de  $\beta$ -lactamases.

### II.C.2. Excrétion par des systèmes d'efflux

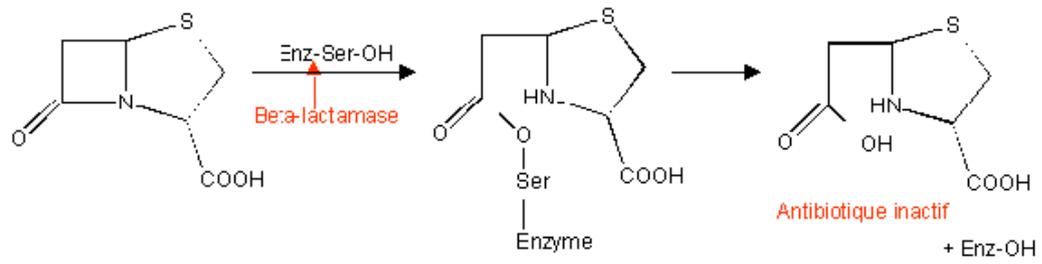
Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries Gram négatif (231). Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou au contraire responsables de « multidrug resistance » (MDR). Pour fonctionner, les pompes à efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par hydrolyse d'ATP (famille ABC) (figure 12). En cas d'hyperexpression de ces systèmes,

Chez les bactéries à Gram positif, les systèmes d'efflux ne sont constitués que d'une pompe transmembranaire. Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe. Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont de type RND comme AcrB chez *Escherichia coli* ou MexB chez *Pseudomonas aeruginosa* (50). Lors d'une hyperexpression, ces systèmes d'efflux, comme celui correspondant aux gènes *marRAB* chez *E. coli*, entraîne une résistance généralement à bas niveau et croisée à différentes familles d'antibiotiques.

### II.C.3. Modification des PLPs

La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines peut-être diminuée par des mutations dans les gènes chromosomiques qui codent pour des PLPs normales ou à l'acquisition de gènes étrangers codant pour des PLPs ayant peu d'effet pour les  $\beta$ -lactamines. La résistance résultant de ces altérations varie suivant les bactéries, la nature des modifications (types de mutations, sur- ou sous-expression des protéines concernées) et l'affinité spécifique des  $\beta$ -lactamines pour les différentes PLPs. C'est un mécanisme de résistance acquis, très largement répandu chez les

Figure 13. Réaction d'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame par une  $\beta$ -lactamase.



bactéries à Gram positif, comme *Staphylococcus aureus* où la résistance à la méticilline est due à la présence d'une PLP ayant une très faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP, la PLP2a, est codée par le gène *mecA* porté par un élément génétique mobile intégré dans le chromosome de *S. aureus*. Chez certaines bactéries à Gram négatif, comme *Neisseria* ou *H. influenza*, la baisse d'affinité des PLPs vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines est due à l'acquisition de fragments d'ADN étranger au niveau des gènes codant les PLPs donnant naissance à des gènes « mosaïques ». Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécilinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1a. Cependant, ce type de mécanisme reste très rare chez ce groupe bactérien.

## II.D. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines enzymatiques

A l'heure actuelle, la production d'enzymes hydrolytiques appelées  $\beta$ -lactamases est le mécanisme de résistance prédominant des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (35, 146). Au début des années 1980, seules quelques enzymes de type plasmidique comme TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues, mais rapidement après l'introduction d'antibiotiques à large spectre tels que les céphalosporines de troisième génération, sont apparues des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu ou BLSE. Depuis, les  $\beta$ -lactamases ne cessent de se diversifier, d'élargir leur spectre d'activité et leur diffusion parmi de nombreuses espèces d'entérobactéries et de bacilles non fermentant tels que *Pseudomonas* spp. et *Actinobacter* spp.

### II.D.1. Les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (figure 13). L'hydrolyse irréversible du noyau  $\beta$ -lactame entraîne alors l'inactivation de l'antibiotique et la perte totale de son activité antibactérienne. Chez les bactéries à Gram positif les  $\beta$ -lactamases sont sécrétées dans le milieu de culture tandis que chez les bactéries à Gram négatif ces enzymes se retrouvent dans l'espace périplasmique. Sur

Tableau 8. Classification selon Ambler des principales  $\beta$ -lactamases d'après Nordmann *et al.* (1998).

Classe	Localisation	Spectre d'activité	Types d'enzymes	Organisme
<b>A</b>	Chromosome	Spectre restreint	TEM-1,2 et SHV-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Plasmide	$\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)	TEM-3-29, 42, 43, SHV-2-9 PER-1,2 CTX-M, CTX-M2, MEN-1, VEB-1, TOHO-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ++ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Plasmide	$\beta$ -lactamases résistantes aux inhibiteurs	TEM-30-41, 44 et 45	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>E. coli</i> ++
	Plasmide	$\beta$ -lactamases résistantes aux inhibiteurs et à large spectre	SHV-10, TEM-33 et 15	<i>E. coli</i>
	Chromosome	Carbapénémases	Nmc A, Sine-1, IMP-1	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia marcescens</i>
<b>B</b>	Chromosome Plasmide	Carbapénémases	IMP-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>C</b>	Plasmide	Céphalosporinases	MIR-1, MOX-1, CMY-1, 2 1.AT-1, BIL-1, FOX-1, ACT-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ++
	Chromosome		AmpC	Bacille Gram négative
<b>D</b>	Chromosome Plasmide		OXA-24- 26,40,51,58,72	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

un plan phylogénétique, les  $\beta$ -lactamases dérivent de l'évolution de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, une étape essentielle à la synthèse du peptidoglycane : les PLPs. Les PLPs et les  $\beta$ -lactamases de séquence homologue sont capables de former un acyl-enzyme et agissent dans l'espace périplasmique. Les distinctions majeures entre les deux enzymes sont leur localisation ainsi que la vitesse à laquelle l'acyl-enzyme est hydrolysée. Les PLPs sont ancrées dans la membrane plasmique avec une capacité d'hydrolyse d'un cycle  $\beta$ -lactame par heure tandis que les  $\beta$ -lactamases situées dans l'espace périplasmique sont beaucoup plus efficaces et hydrolysent 1000 noyaux par seconde (102, 152, 214).

A ce jour, plus de quatre-cent  $\beta$ -lactamases différentes ont été identifiées. Cependant de nouvelles  $\beta$ -lactamases continuent à émerger dans le monde (137). Sur la base de leur mécanisme catalytique, les  $\beta$ -lactamases sont divisées en deux types : les sérines- $\beta$ -lactamases, utilisant un site actif à sérine pour hydrolyser le noyau  $\beta$ -lactame et les métallo- $\beta$ -lactamases nécessitant des ions  $Zn^{2+}$  (114). La diversité des  $\beta$ -lactamases a entraîné de nombreuses tentatives de classification. Deux sont actuellement utilisées : la classification structurale de Ambler basée sur la séquence primaire en acides aminés d'éléments conservés du site enzymatique actif et la classification fonctionnelle de Bush-Jacobi-Medeiros qui repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des  $\beta$ -lactamases aux inhibiteurs (7, 39). Selon la classification de Ambler, utilisée en pratique médicale, il est possible de définir phylogénétiquement quatre classes de  $\beta$ -lactamases : les classes A, B, C ou D. Au sein de chacune de ces classes, il existe des sous-groupes en fonction du support génétique des gènes de résistance, chromosomique ou plasmidique (tableau 8).

**La classe A** représente les enzymes de type sérine. Il existe environ 23 types de  $\beta$ -lactamases de nature chromosomique et 50 enzymes de type plasmidique. Par définition, cette classe regroupe les pénicillinases et les céphalosporinases qui sont inhibées par l'acide clavulanique, un inhibiteur des  $\beta$ -lactamases. Les enzymes formant la classe A sont décrites comme hydrolysant l'ampicilline et la ticarcilline. Elles sont sans action sur les céphalosporines de troisième génération (C3G), le céfoxitine et les carbapénèmes. Toutefois, des mutations spontanées conduisant à la surexpression ou introduisant des changements précis dans la structure primaire des  $\beta$ -lactamases peuvent accroître leur activité vis-à-vis de  $\beta$ -lactamines relativement résistantes à l'hydrolyse enzymatique. C'est pourquoi, dans les années 1990 sont apparues des enzymes dérivant des pénicillinases à spectre étroit, capables

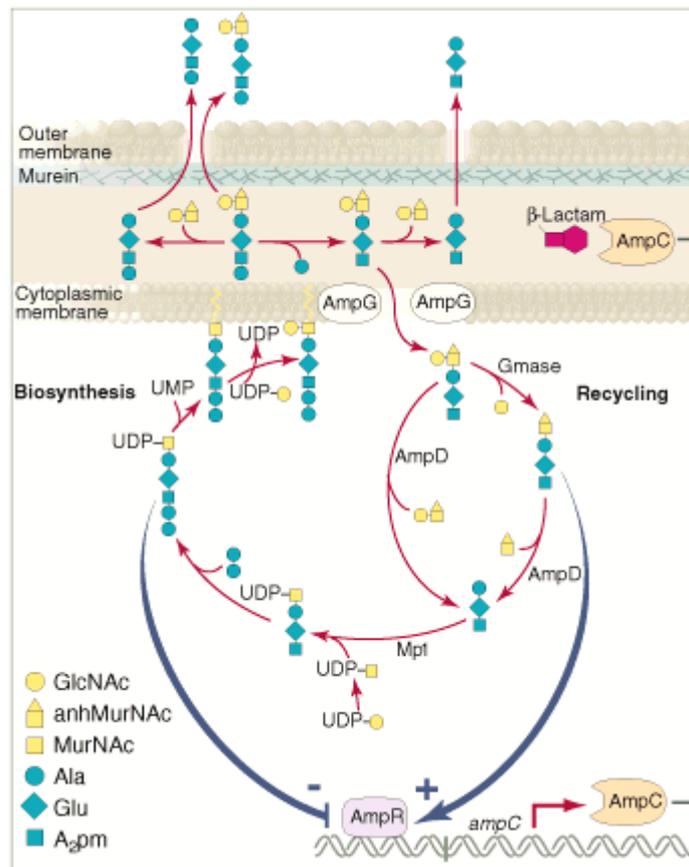


Figure 14. Modèle de voie de régulation des  $\beta$ -lactamases de type AmpC basé sur la détection des niveaux relatifs  $\beta$ -lactamine et de muréine dans le cytoplasme d'après Jacobs *et al.* (1997).

d'inactiver des C3G et appelées de ce fait « $\beta$ -lactamases à spectre élargi» ou BLSE. Les principales enzymes représentantes de ce groupe sont les TEM, SHV et plus récemment les CTX-M (tableau 8) (179).

**La classe B** correspond aux métallo-enzymes dépendants de la présence d'ions zinc ou magnésium. Ces enzymes peuvent être inhibées *in vitro* par la présence de chélateur d'ions comme l'EDTA, cependant l'acide clavulanique est inefficace. Phénotypiquement les métallo-enzymes confèrent la résistance aux pénicillines, aux C3G, aux carbapénèmes ou encore aux céphamycines (165).

Les sérines-enzymes de **la classe C** regroupent toutes les céphalosporinases de type AmpC insensibles à l'acide clavulanique et qui hydrolysent les céphalosporines 5 à 10 fois plus vite que la benzylpénicilline. On distingue les céphalosporinases chromosomiques constitutives ou inductibles et les céphalosporinases plasmidiques.

Les **céphalosporinases chromosomiques constitutives** d'AmpC s'expriment généralement à très bas niveau chez *E. coli* ou *Shigella* et ne contribuent pas de façon significative à la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez ces espèces. Cependant des mutants promoteurs forts peuvent exister et entraîner une hyperproduction de la céphalosporinase (46). Dans ce cas, les bactéries deviennent résistantes à l'amoxicilline et à la céfalotine. L'activité des C2G et C3G peut être alors diminuée tandis que celle de l'imipénème reste normale.

*A contrario*, les **céphalosporinases chromosomiques inductibles** décrites chez de nombreuses espèces d'entérobactéries (*Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas*, *P. aeruginosa*) sont induites à haut niveau en présence de  $\beta$ -lactamines (figure 14). La synthèse de ces céphalosporinases AmpC codées par le gène *ampC* est contrôlée par un système de régulation comprenant les protéines AmpR, AmpD et AmpG (112). La protéine bifonctionnelle AmpR correspond à un activateur transcriptionnel du gène *ampC* inductible en présence de  $\beta$ -lactamines ou répresseur en leur absence. La fixation d'une  $\beta$ -lactamine inductrice sur les PLPs bactériennes provoque alors une accumulation dans la cellule de précurseurs du peptidoglycane destiné au recyclage de la muréine. Ces précurseurs sont transportés de l'espace périplasmique vers le cytoplasme par l'intermédiaire de la perméase AmpG puis sont dégradés en muuropeptides recyclables par l'amidase AmpD. Le niveau cytoplasmique de muuropeptides est indicateur de la présence ou non de  $\beta$ -lactamines

pour la protéine AmpR qui contrôle la production de  $\beta$ -lactamases (51). En effet la fixation de mucopeptides sur la protéine AmpR va provoquer sa conversion en activateur du gène *ampC* et ainsi permettra la production à haut niveau de céphalosporinases.

Plus récemment, des  $\beta$ -lactamases AmpC à spectre étendu (ESAC) ont été décrites chez des isolats cliniques d'*E. coli*. Il s'agit d'enzymes dérivées des céphalosporinases chromosomiques capables d'inhiber efficacement les céphalosporines à spectre étendu (150). Depuis quelques années, des  **$\beta$ -lactamases AmpC plasmidiques** comme CMY, FOX, MIR, MOX, ACT-1 ont émergé en particulier chez les bactéries du genre *Klebsiella*, *Salmonella*, *E. coli*...etc (176). Le phénotype de résistance est identique à celui des céphalosporinases hyperproduites avec généralement une résistance aux C3G, associé avec une résistance à l'acide clavulanique et souvent à la céfoxitine. Il est à noter que la majorité de ces enzymes en position plasmidique ne sont pas inductibles.

Enfin, **la classe D** regroupe les enzymes les plus éloignées phylogénétiquement des trois groupes vus précédemment. Ces enzymes sont très hétérogènes et représentent les  $\beta$ -lactamases dites « oxacillinases » ou OXA pour « Oxacillin-hydrolysing abilities ». En effet, les oxacillinases se caractérisent par leur excellent taux d'hydrolyse de la cloxacilline et de l'oxacilline. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique mais peuvent l'être par les ions chlorure *in vitro*.

#### II.D.2. Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne (120). Il n'existe pas de définition consensuelle et précise des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. Les BLSE sont définies comme des  $\beta$ -lactamases capables de conférer une résistance bactérienne vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines de première, deuxième et troisième génération ainsi que l'aztreonam par hydrolyse de ces antibiotiques. Les BLSE sont sensibles à la présence d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase comme l'acide clavulanique (39, 170). Aujourd'hui, plus de 200 BLSE de classe A ont été réparties dans 11 familles selon leur séquence en acides aminés : TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA, une enzyme appartenant à la classe D. L'apparition et la diversité des BLSE s'expliquent par l'accumulation de mutations des gènes codant les enzymes TEM et SHV. En effet, la

moindre modification du site actif de l'enzyme conduit à un changement de l'activité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat. C'est le cas des quatre enzymes SHV-2, 6, 8 et 11 apparues à la suite de la substitution d'un seul acide aminé de la protéine d'origine SHV-1 (111). Il a également été montré que, pour les enzymes de type TEM dérivées de l'enzyme TEM-1, les substitutions les plus courantes sont le glutamate en lysine en position 104, l'arginine en sérine en position 164, la glycine en sérine en position 238 et le glutamate en lysine en position 240 (35). Une seule de ces substitutions peut entraîner une importante modification de l'affinité de l'enzyme. Par exemple, lorsque l'acide aminé devient une sérine, l'interaction entre le  $-NH_3$  de la sérine et le groupement oxy-amino des C3G se traduit par une meilleure stabilité de la  $\beta$ -lactamine dans le site actif de l'enzyme.

### II.D.3. Les céfotaximases ou CTX-M

Au Japon en 1981, Matsumoto *et al.* découvrirent, à la suite d'un traitement à une  $\beta$ -lactamine chez le chien, une souche de *E. coli* résistante au céfotaxime par la production d'une BLSE non-TEM, non-SHV désignée FEC-1. C'est en 1989, en Allemagne que Bauernfeind *et al.* identifient chez une souche clinique de *E. coli* résistante au céfotaxime, une enzyme non-TEM et non-SHV appelé CTX-M-1, en référence à son activité hydrolytique contre le céfotaxime (24, 33). Sur la base des homologies de séquence d'acides aminés, ces céfotaximases ou CTX-M codées par le gène  $bla_{CTX-M}$  semblent dériver des céphalosporinases chromosomiques naturelles des bactéries de l'environnement *Kluyvera ascorbata* et *Kluyvera georgiana*, codées respectivement par les gènes  $bla_{KLUA}$  et  $bla_{KLUC}$ . Les phases ouvertes de lecture en amont des gènes  $bla_{KLUA}$  et  $bla_{CTX-M}$ , nommées Orf1 et Orf3 se révèlent également très similaires avec 69% d'identité. Actuellement, 50 enzymes CTX-M sont répertoriées et classées en cinq groupes sur la base de leur séquence en aminoacide: CTX-M-1 (CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15), CTX-M-2 (CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, Toho-1), CTX-M-8 (CTX-M-8, -40), CTX-M-9 (CTX-M-9, -13, -14, -16, -18, -19 and Toho-2) et CTX-M-25 (CTX-M-25, -26, -39, -41) (179). Ces CTX-M sont généralement plus actives vis à vis de la ceftriaxone que de la ceftazidime, cependant des mutations peuvent accroître leur activité contre la ceftazidime. Par exemple, les enzymes CTX-M-15 et 32 diffèrent des enzymes CTX-M-3 et 1, respectivement, par une substitution de l'asparagine en glycine en position 240. Cette seule modification suffit à augmenter de 100 fois leur activité

contre la ceftazidime (47). De même, la séquence en acides aminés du variants CTX-M-14 diffère de CTX-M-9 par une substitution de l'alanine en valine (Ala-231 → Val). Des éléments mobilisables portant les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> ont été identifiés. Ces éléments mobiles sont principalement localisés sur un large plasmide qui porte de multiples résistances. Les séquences d'insertions de type *ISEcpI* apparaissent souvent impliquées dans la mobilisation de ces gènes cependant, il ne s'agit pas d'une généralité, particulièrement pour les enzymes de type 2 et 9 (33). Les céfotaximases sont des enzymes appartenant à une famille de BLSE hétérogènes, à diffusion rapide, comparables aux enzymes de type TEM-1 dans les années 1970.

#### II.D.4. Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases et la résistance associée

Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases sont des  $\beta$ -lactamines qui ne possèdent par eux même qu'une faible activité antibactérienne intrinsèque sans intérêt clinique. Mais contrairement aux autres  $\beta$ -lactamines, ces inhibiteurs se lient de façon irréversible au site catalytique des  $\beta$ -lactamases, produisant un complexe inactif (146). N'étant pas relargués, ils sont définis comme des « inhibiteurs suicides ». L'**acide clavulanique**, produit naturellement à partir de *Streptomyces clavuligerus*, a été découvert dans les années 1970. Il est considéré comme un inhibiteur des  $\beta$ -lactamases plasmidiques des bactéries à Gram positif et Gram négatif ainsi que des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *K. pneumoniae* et *Bacteroides fragilis*. Depuis ce temps d'autres molécules inhibitrices de  $\beta$ -lactamases ont été découvertes chez des microorganismes ou semi-synthétisées comme le sulbactame et le tazobactame. L'approche thérapeutique la plus utilisée en clinique est l'utilisation de la combinaison des inhibiteurs suicides avec les pénicillines. Les combinaisons amoxicilline/acide clavulanique, ampicilline/sulbactame et pipéracilline/tazobactame inhibent la croissance des bactéries produisant les  $\beta$ -lactamases de classe A telles que les enzymes de type TEM, SHV et CTX-M. Cependant au début des années 1990, de nouvelles  $\beta$ -lactamases résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases ont été mises en évidence en France, en Grèce et au Royaume-Uni (35). L'analyse de la séquence de ces enzymes a montré qu'il s'agissait de  $\beta$ -lactamases de type TEM ayant mutée par substitution aux positions 69, 244, 275 et 276. De ce fait, les mutations des acides aminés sur TEM provoquent une baisse d'affinité de la  $\beta$ -lactamase pour l'ensemble des  $\beta$ -lactamines et en particulier pour les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase. Ces

enzymes de classe A sont appelées IRT ou TRI pour « TEM résistant aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases» mais ne sont pas considérées comme des BLSE. Plus d'une quinzaine de ces enzymes ont été décrites et retrouvées dans des souches d'origine clinique comme *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* (35, 38).

## II.E Supports génétiques et mobilité de la résistance aux $\beta$ -lactamines

Les supports génétiques des gènes de résistances capables de se répliquer et donc transmis aux cellules filles sont le chromosome et le plasmide. D'un point de vue général, les gènes de résistance sont toujours portés par ces structures génétiques dans la bactérie. Le chromosome et les plasmides sont également le support de diverses structures génétiques comme les transposons et les intégrons capables de véhiculer les gènes de résistance soit au niveau intra-cellulaire (transposons, cassette de gène des intégrons) ou inter-cellulaire (plasmide, transposons).

### II.E.1. Les supports génétiques

#### II.E.1.a. Le chromosome et les plasmides

**La résistance chromosomique** aux antibiotiques dont les  $\beta$ -lactamines, peut être due soit à des mutations soit à la présence naturelle de gènes de résistance. La résistance par mutation se transmet aux cellules filles. La fréquence d'apparition des mutations est de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-10}$  par génération. Le chromosome peut également être le support de structures génétiques intégrées comme les plasmides, transposons ou intégrons.

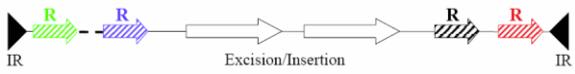
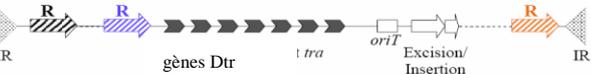
Découverts dans les années 60, **les plasmides** sont des molécules d'ADN bicaténaire circulaires, indépendantes du chromosome et capables d'autoréplication. Ils sont de taille variable allant de quelques kilobases (kb) à 500 kb. Les plasmides ne sont pas essentiels à la survie de la bactérie, mais représentent un atout majeur dans des conditions environnementales particulières et hostile. Ils sont le support génétique de nombreuses propriétés comme des fonctions métaboliques, la résistance aux antibiotiques, aux désinfectants, aux métaux lourds et aux toxines bactériennes. Les plasmides se caractérisent par leur type et origine de réplication (*OriV*), leur nombre de copies, leur compatibilité entre plasmides, leur mobilisation, leur spécificité d'hôte et leur origine de transfert (*OriT*). La notion de spécificité de l'hôte des plasmides est très importante dans le transfert de gènes entre espèces bactériennes et se détermine par sa capacité de réplication dans différentes espèces et genres bactériens. En effet, les plasmides isolés de bactéries à Gram négatif ne se répliquent pas chez les bactéries à Gram positif. Toutefois il existe des plasmides comme le réplicon RK2 isolé chez des bactéries à Gram négatif, capable de se transférer et de se

répliquer dans plus de 30 espèces bactériennes dont certaines bactéries à Gram positif voire même des levures (48). Plusieurs systèmes de classifications des plasmides dont celui basé sur les groupes d'incompatibilité (Inc) sont apparus dans les années 1970. Dans ce système, deux plasmides appartenant au même groupe d'incompatibilité ne peuvent coexister dans la même bactérie et s'excluent mutuellement. Chaque groupe d'incompatibilité implique également une sélectivité du spectre d'hôte et contribue à la capacité de diffusion des plasmides. Les principaux groupes d'incompatibilité liés aux gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> sont les plasmides à spectre d'hôte étroit de type IncHI2, IncF, IncI et les plasmides à large spectre, IncP-1 $\alpha$  (167). Ainsi, les gènes *bla*<sub>CTX-M-14</sub> et *bla*<sub>CTX-M-15</sub> sont retrouvés sur les plasmides du groupe d'incompatibilité IncFI tandis que *bla*<sub>CTX-M-9</sub> est essentiellement lié au groupe IncHI2-R478 (92). Les plasmides sont également classés selon leur transférabilité par conjugaison. Ainsi les plasmides peuvent être conjuguatifs ou non-conjuguatifs. **Les plasmides conjuguatifs** généralement de grande taille sont autotransférables et possèdent toute l'information génétique dont la fonction Tra codée par les gènes *tra*, nécessaire à leur propre transfert d'une bactérie à une autre. Parmi les gènes *tra*, la composante Dtr (DNA transfer and replication) impliquée dans le transfert du plasmide se distingue de la composante Mpf (Mating pair formation) indispensable à la formation du pilus sexuel liant les cellules donneuses et receveuses. **Les plasmides non-conjuguatifs** peuvent être divisés en plasmides mobilisables ou non. Les plasmides mobilisables contiennent une origine de transfert et la composante Dtr. Ils peuvent être transférés à une autre cellule uniquement par mobilisation d'un autre plasmide présentant la fonction Mpf. Lorsque les plasmides sont non mobilisables, seule leur intégration avec un plasmide conjuguatif permettra le transfert par conjugaison à une autre cellule. C'est le cas du plasmide pWES-1 portant le gène *bla*<sub>CTX-M-53</sub>.

#### *II.E.1.b. Les éléments transposables et les intégrons*

Les éléments transposables sont capables d'être transférés d'un site donneur vers un site cible, localisés ou non sur la même molécule d'ADN, plasmidique ou chromosomique. Ces fragments d'ADN ne peuvent généralement se répliquer, mais codent pour les déterminants de leur transposition. La transposition est un mécanisme d'évolution

Tableau 9. Structure de base schématisée des différents types d'éléments transposables selon la nomenclature proposée par Roberts *et al.* (2008).

Type d'éléments transposables	Définition	Structure schématisée
Séquence d'insertion (IS)	Elément codant pour une transposase, encadré de 2 séquences inversées répétées (IR)	
Transposon composite	Elément codant pour une résistance à un antibiotique, encadré de 2 éléments IS.	
Transposon non-composite	Elément codant pour une excisionase et porteur d'un ou plusieurs gènes accessoires.	
Transposon mobilisable (MTn)	Elément nécessitant la présence d'éléments conjugatifs pour transférer d'une cellule à une autre (plasmides, CTn)	
Transposon conjugatif (CTn)	Elément portant les gènes pour l'excision, le transfert conjugatif et l'intégration dans le génome de la cellule hôte. Ils portent également des gènes de résistance.	

rapide qui consiste en l'insertion de gènes de taille définie au sein d'un génome sans aucune homologie. Les éléments transposables impliqués dans la résistance aux antibiotiques sont les suivants : les séquences d'insertion (IS), les transposons conjugatifs, les transposons mobilisables, les transposons composites ou les transposons non-composites dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau 9 (192).

**Une séquence d'insertion (IS)** est un simple gène qui code pour une transposase, enzyme responsable de la transposition. Elle est encadrée par des séquences répétées inversées droite et gauche, IR<sub>r</sub> et IR<sub>l</sub>, de 10 à 40 pb. Ces séquences IR sont impliquées dans la fixation de la transposase lors de la phase de coupure, d'excision et de transposition de l'ADN. Les IS reconnaissent une séquence de l'ADN cible plus ou moins spécifique selon l'IS impliquée (148). Dans la mobilisation des gènes de résistance aux β-lactamines comme le gène *bla*<sub>CTX-M</sub>, les séquences d'insertion *ISEcp1* et *ISEcp1*-like sont de l'ordre de 42 à 79 pb et sont placées en amont des Orfs codant les enzymes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-15 et CTX-M-20 (33, 98, 166). Cette *ISEcp1* est composée de deux séquences inversées répétées imparfaites et d'un élément CR1 ou « région conservée 1 » anciennement appelé Orf513, codant une transposase de 420 acides aminés (30, 123, 167). Récemment, une étude *in vitro* démontrait que l'élément *ISEcp1B* pouvait reconnaître un large éventail de séquences d'ADN augmentant ainsi les capacités de disséminations du gène *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.

**Les transposons composites (Tn)** sont encadrés de deux séquences d'insertion en orientation directe ou inversée à leurs extrémités qui encadrent différents gènes de résistance aux antibiotiques et/ou cataboliques. De tailles généralement comprises entre 3 et 10 kb, ces structures modulaires contiennent un ou plusieurs gènes. De plus, l'une des deux séquences IS code pour une transposase fonctionnelle et l'autre code pour un régulateur de la transposition. Les deux IS, en sens inverse et suffisamment proches sont capables de coopérer pour former un nouveau transposon composite (148). Plusieurs transposons composites ont été décrits tel que le transposon *Tn10* impliqué dans le transfert de la résistance à la tétracycline, constitué de deux *IS10* et de plusieurs gènes *tetA* et *tetR*. Les transposons *Tn9* (*IS1*) et *Tn5* (*IS50*) confèrent respectivement la résistance

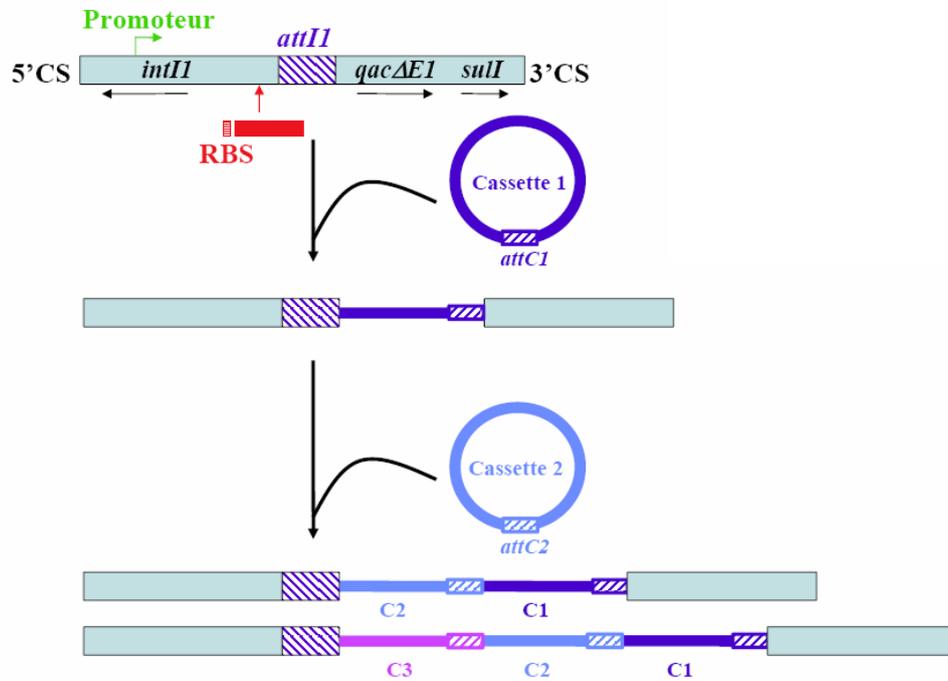
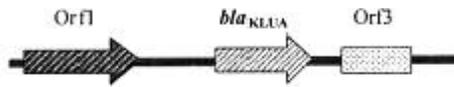


Figure 15. Schéma de l'acquisition de cassette de gène par un intégron de classe 1.

au chloramphénicol et à la kanamycine et la streptomycine. **Les transposons non-composites** se caractérisent par l'absence de séquences IS à leurs extrémités mais par la présence de séquences terminales répétées en orientation inverse (IR). Le transposon Tn3, représentant de cette famille le plus connu, est constitué de 2 séquences IRL et IRR encadrant un gène *tnpA* codant pour la transposase, un gène *tnpR* codant pour la résolvasse, un site de recombinaison spécifique (res) et un gène *bla* de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Le terme de **transposon conjugatif** (CTns) a été pour la première fois décrit dans les années 80, avec la découverte du transposon Tn916 de *Enterococcus faecalis* et CTnDOT de *Bacteroides thetaiotaomicron* (206, 237). Le spectre d'hôte des transposons conjugatifs ou éléments intégratifs et conjugatifs (ICE) est large, il permet des transferts vers la quasi-totalité des bactéries à Gram positif mais également vers des bactéries à Gram négatif. Les CTns sont des éléments chimériques de grande taille cumulant les propriétés d'intégration des bactériophages et les propriétés de transfert des plasmides conjugatifs (191, 37). La plupart d'entre eux contiennent le gène *xis* et le gène *int* codant respectivement pour une excisionase et pour une recombinase issues des enzymes de la famille du phage  $\lambda$  et les gènes codant pour les fonctions Tra nécessaires au transfert conjugatif. **Les transposons mobilisables** se distinguent des transposons conjugatifs par l'absence des fonctions nécessaires à leur propre transfert. Ces fonctions sont apportées par des plasmides ou transposons conjugatifs. Les transposons mobilisables identifiés chez *Clostridium perfringens* contiennent une recombinase à sérine (résolvasse) qui produit l'excision et l'intégration du Tn4451, Tn4452 conférant une résistance au chloramphénicol. Ce groupe d'éléments code également pour une protéine de « mobilisation » TnpZ qui, par l'action du site *oriT* localisé sur le transposon, et en présence d'un élément conjugatif co-résident, promeut le mouvement de l'intermédiaire circulaire non répliqué et du plasmide sur lequel réside le transposon (5, 4, 13).

**Les intégrons** constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes dont le support mobile est le transposon. Ces cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique (figure 15). Les intégrons peuvent être divisés en deux groupes majeurs répartis en 4 classes : les intégrons de résistance (classe 1, 2 et 3) et les super-intégrons (classe 4) constitués de plusieurs intégrons de grandes tailles, eux-même localisés sur le chromosome et

A. Locus chromosomique codant  $bla_{KLUA}$  chez *K. ascorbata*

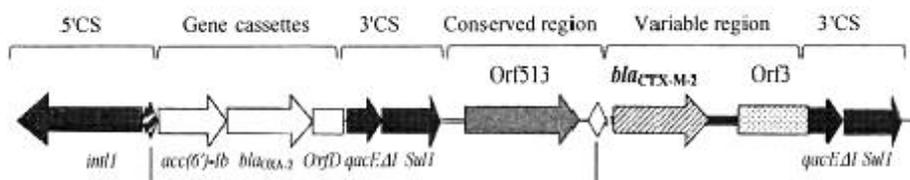


B. Plasmide porteur du gène  $bla_{CTX-M-2}$  associé à *ISEcp1* et un fragment de 17 pb du site d'insertion hypothétique de Orf513.



fragment de 17 pb : site d'insertion hypothétique du locus chromosomique codant le gène  $bla_{CTX-M}$

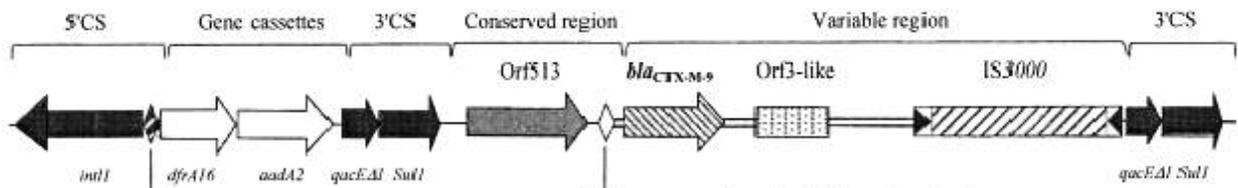
C. Plasmide porteur du gène  $bla_{CTX-M-2}$  inséré dans un intégron complexe de classe 1 InS21 et In35



Site d'insertion de cassette de gène

fragment de 28 pb : site d'insertion hypothétique du locus chromosomique codant le gène  $bla_{CTX-M-2}$

D. Plasmide porteur du gène  $bla_{CTX-M-9}$  inséré dans un intégron complexe de classe 1 In60



Site d'insertion de cassette de gène

fragment de 28 pb : site d'insertion hypothétique du locus chromosomique codant le gène  $bla_{CTX-M-9}$

Figure 16. Comparaison des éléments génétiques mobiles porteurs des gènes  $bla_{CTX-M}$  dans le chromosome de *Kluyvera ascorbata* (A) et dans les plasmides porteurs de ces gènes avec *ISEcp1* (B) ou inséré dans un intégron complexe de classe 1 InS21 et In35 (C) et In60 (D) d'après Bonnet *et al.* (2004).

portant des cassettes codant des protéines de fonction variée (94). Un intégron minimal est constitué d'une plateforme codant une intégrase *IntI*, localisée à proximité d'un site de recombinaison *attI*, et d'une cassette contenant un gène de résistance et un site de recombinaison *attC*. Les cassettes vont s'intégrer à *attI*, se réarranger dans l'intégron résultant, et finalement se propager dans une population par transfert horizontal. Ce système génétique modulaire est capable d'incorporer des cadres ouverts de lecture et de les convertir en gènes fonctionnels en leur fournissant un système d'expression. Ils permettent ainsi l'expression de cassettes de gènes et agissent donc comme des vecteurs naturels de clonage et d'expression (180). A ce jour, plus de 70 différents gènes de résistance ont été identifiés dans des intégrons. A titre d'exemple près de 3% du génome de *Vibrio cholerae* est constitué par un intégron, SXT, contenant au moins 216 gènes non identifiés regroupés dans 179 cassettes. Parmi les gènes codant une résistance aux  $\beta$ -lactamines, les gènes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> et *bla*<sub>CTX-M-2</sub> ont été observés dans des intégrons de classe 1, désignés respectivement *In60* et *In117* et liés à *ISCR1* (figure 16) (199). La plupart de ces intégrons se révèle être associée à différents transposons comme *Tn21* ou *Tn1696*. Ces exemples montrent les incroyables stratégies de réarrangements génétiques sophistiqués des bactéries dans le but de diffuser leurs gènes de résistance à d'autres bactéries.

### II.E.2. Le transfert horizontal de gènes de résistance

Lorsque la résistance aux antibiotiques est inhérente à une espèce bactérienne, la dissémination de la résistance s'opère principalement par une diffusion clonale de la bactérie résistante (transfert vertical). A l'opposé, la résistance acquise par mutation ponctuelle, par hyperproduction d'un gène déjà présent ou par acquisition de gènes de résistance exogènes peut être transférée verticalement (à la descendance) ou horizontalement (aux autres lignées bactériennes) (133). Ce transfert peut s'effectuer entre bactéries très éloignées phylogénétiquement, voire même entre bactérie à Gram positif et Gram négatif. Le transfert horizontal est le principal mécanisme responsable de la dissémination des gènes de résistance au sein du monde bactérien et concerne 80 % des cas de résistance observés en médecine humaine (28). Pour être efficace, le transfert horizontal nécessite la présence de supports génétiques autonomes capables de se répliquer et de s'exprimer dans la cellule réceptrice.

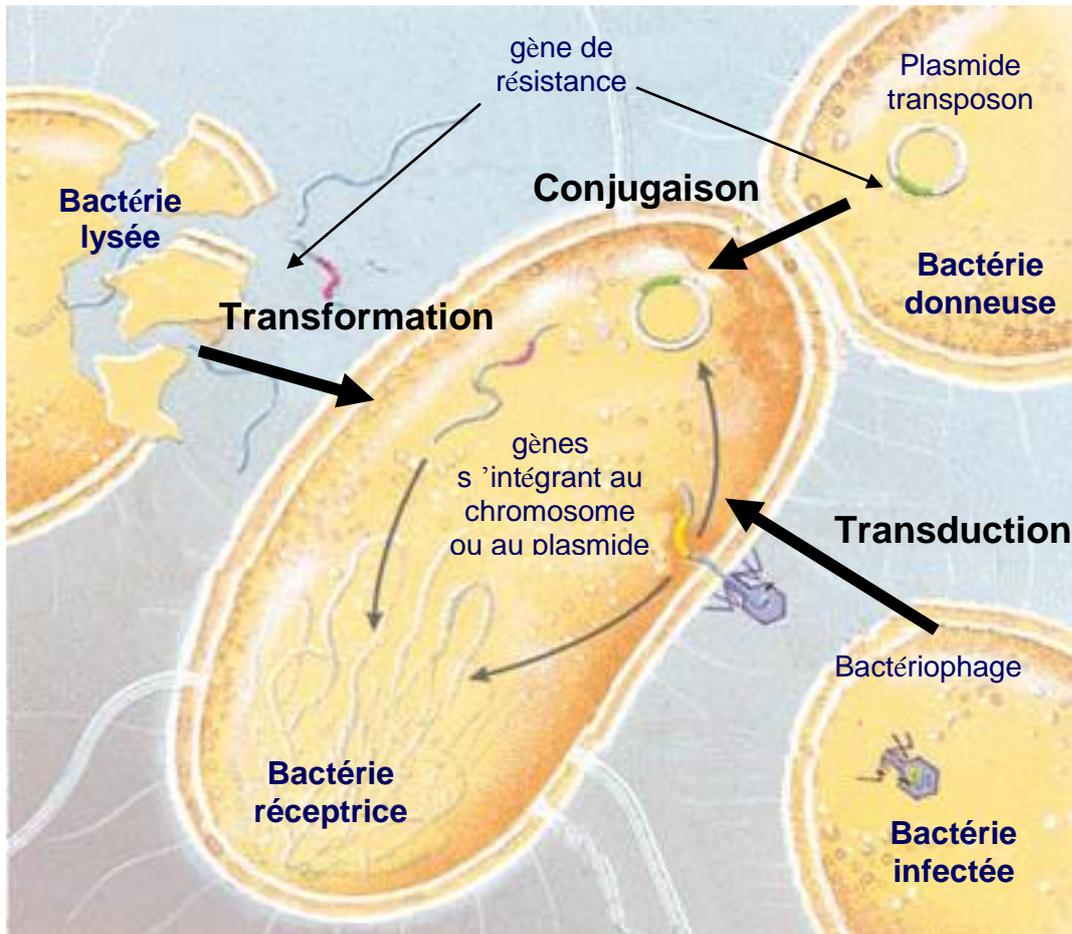


Figure 17. Représentation schématique des différents mécanismes de transfert horizontal de gène.

Le transfert horizontal peut résulter de trois processus : la transformation qui implique le transport intracellulaire et la recombinaison d'un ADN libre, la transduction par laquelle l'ADN de l'hôte est encapsidé dans un bactériophage et la conjugaison, un mécanisme exigeant car dépendant d'un contact étroit entre les cellules (figure 17) (61).

#### *II.E.2.a. La transformation ou compétence naturelle*

Il s'agit d'un mécanisme d'acquisition d'ADN libre par certaines espèces bactériennes capables au cours de leur cycle cellulaire de présenter un état physiologique (état de compétence) nécessaire à la fixation et l'absorption d'ADN par ces bactéries. Dans la bactérie réceptrice, l'ADN exogène subit une recombinaison génétique afin d'être intégré de façon stable au génome et d'être transmis aux cellules filles. Les espèces telles que *S. pneumoniae*, *Neisseria* spp., *Acinetobacter* spp. présentent un haut niveau de transformation naturelle. Le risque d'acquisition de matériel génétique exogène en termes de sécurité sanitaire et alimentaire concerne essentiellement l'acquisition d'ADN étranger provenant des organismes génétiquement modifiés utilisés dans l'alimentation. Cependant, qu'il s'agisse de plantes ou de bactéries génétiquement modifiées comme *Lactococcus lactis*, aucune absorption d'ADN par les bactéries du tractus intestinal n'a été mise en évidence (29, 211, 227). Cependant, des études récentes ont montré que de faibles concentrations de certains aminosides ou fluoroquinolones (molécules très utilisées en médecine vétérinaire chez les volailles et poissons d'élevage) peuvent induire de façon très efficace l'état de compétence chez *S. pneumoniae* sans tuer les bactéries (62, 187). Le stress induit par les antibiotiques augmenterait ainsi le taux d'échange génétique y compris celui des gènes conférant la résistance. Toutefois, la transformation naturelle a ses limites. En effet, outre le peu d'espèces naturellement compétentes, l'ADN exogène doit, pour s'intégrer dans le génome, présenter une séquence très similaire avec l'ADN de la cellule réceptrice. Dans le cas contraire, l'ADN nu sera rapidement dégradé. De ce fait, la transformation jouerait un rôle limité dans le transfert horizontal de gènes de résistances (78, 216).

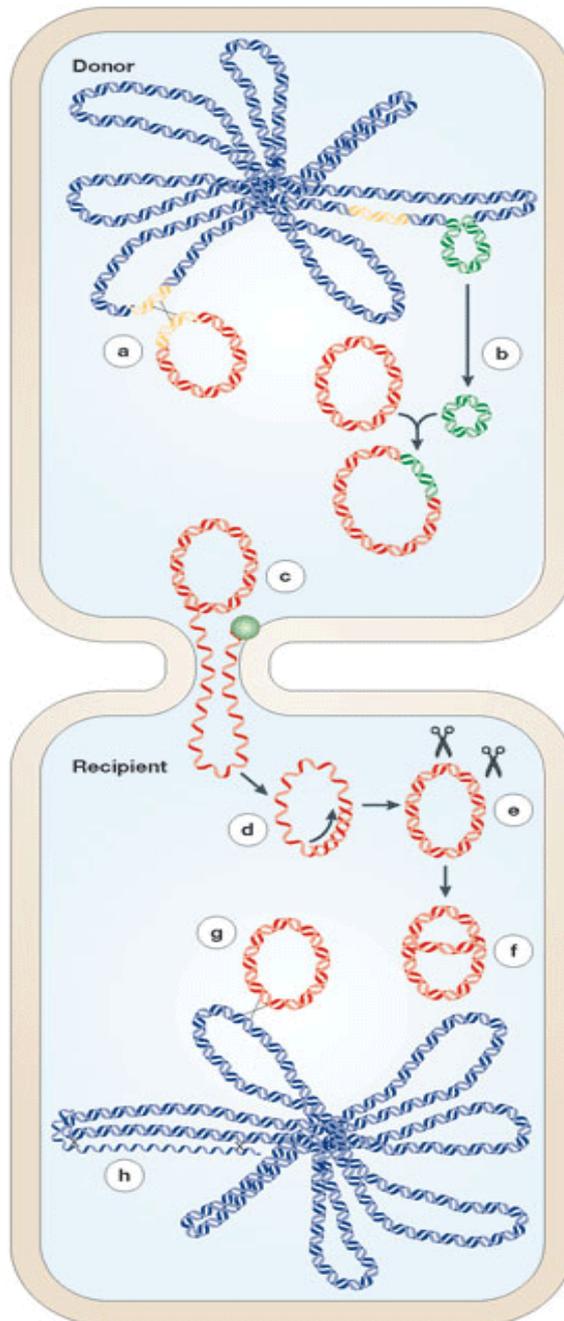


Figure 18. Représentation schématique des événements impliqués dans le transfert horizontal de gènes dans la cellule donneuse d'après Thomas *et al.* (2005): a, intégration du plasmide par recombinaison entre les séquences d'insertion; b, mouvement de l'élément transposable avec un intermédiaire circulaire du chromosome au plasmide; c, initiation de la réplication par « rolling-circle » au moment du transfert. Dans la souche réceptrice: d, recircularisation; e, attaque par des endonucléases de restriction; f, réplication; g, intégration dans le chromosome par recombinaison; h, recombinaison entre l'ADN transféré et l'ADN.

### *II.E.2.b. La transduction*

La transduction est un transfert d'ADN bactérien par l'intermédiaire de bactériophage. Les gènes bactériens sont incorporés dans une capsid du phage suite à des erreurs commises au cours du cycle du virus. Le virus transportant ces gènes les injecte alors dans une autre bactérie, complétant le transfert. Il existe deux types de transduction : la transduction généralisée et la transduction spécialisée. **La transduction généralisée** a lieu au cours du cycle lytique d'un phage virulent ou tempéré et transfert n'importe quelle partie du génome bactérien (70). Dans **la transduction spécialisée** ou restreinte, la particule transductrice ne porte que certaines parties spécifiques du génome. Elle résulte d'une erreur dans le cycle lysogène. Ainsi seuls les gènes proches du site d'intégration du prophage peuvent être encapsidés et transférés à une autre bactérie. Les phages ont été décrits dans de nombreuses espèces bactériennes comme *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, les entérobactéries ...etc. Bien que la transduction ait été mise en évidence dans le tractus digestif, l'impact de la transduction dans le transfert horizontal de gènes de résistance au sein des bactéries intestinales n'a jamais été évalué (70, 141).

### *II.E.2.c. La conjugaison*

Découverte en 1946, la conjugaison bactérienne fut observée pour la première fois chez *E. coli*, par Joshua Lederberg. Il s'agit du mécanisme de transmission le plus important et le plus fréquemment rencontré (6). La conjugaison est un processus par lequel l'ADN est transféré d'une bactérie à une autre via un contact cellule-cellule et un système de transfert codé par les gènes *tra* localisés sur le chromosome, sur les plasmides et sur les transposons conjuguatifs (figure 18). Elle peut s'effectuer par quatre mécanismes différents : (1) par transfert d'un plasmide auto-transférable comme le plasmide F et le plasmide RP4 de *E. coli* ; (2) par mobilisation, grâce à l'action d'un plasmide conjuguatif ; (3) par cointégration où deux plasmides fusionnent pour ne former qu'un ; (4) par transfert de transposons conjuguatifs (70, 93). Chez les bactéries à Gram négatif, le système de conjugaison repose sur la synthèse de pili sexuels. Suite à la formation du pont cytoplasmique, le transfert du simple brin d'ADN est initié spécifiquement à l'origine de transfert (*oriT*) puis interrompu par une relaxase. L'intégrité de l'élément transféré est restaurée par la réplication du simple brin tout

près du pont cytoplasmique. La structure du pilus conjugatif, rigide ou flexible, jouerait un rôle important, notamment dans l'environnement intestinal. Il est connu que la synthèse d'un pilus rigide chez *E. coli* entraîne une fréquence de transfert du plasmide plus faible lors de tests *in vitro* en milieu solide versus liquide, alors que le plasmide d'une même souche présentant un pilus flexible est transféré à l'identique en milieu solide et liquide. Ces observations ont été confirmées *in vivo*, dans un modèle de souris, où le plasmide de la souche portant un plasmide codant un pili flexible était transféré mais non détecté chez une souche synthétisant un pilus rigide (141). Une possible explication serait que le pilus flexible résisterait davantage aux mouvements péristaltiques ainsi qu'au flux continu exercé par le contenu intestinal. Chez les bactéries à Gram positif, les bases du contact seraient en partie dues à la production de protéines membranaires induites par des phéromones, ce qui permettrait l'agrégation des cellules donneuses et réceptrices, puis le transfert des gènes de résistance (61, 216).

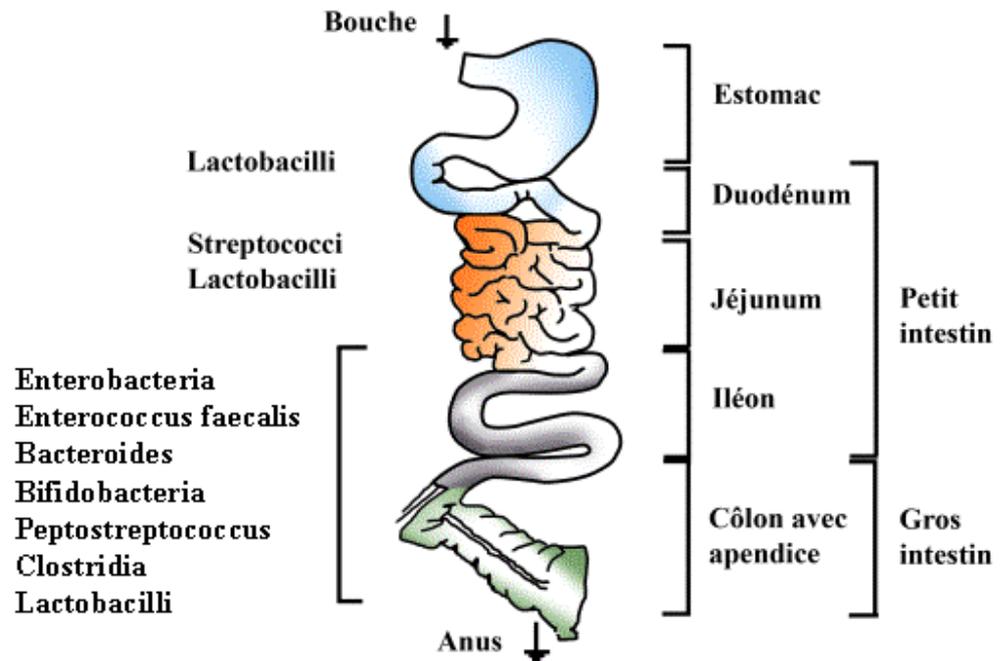


Figure 19. Schéma simplifié décrivant la répartition des bactéries le long du tube digestif d'après Drasar *et al.* modifié (1985).

### III. LA DISSEMINATION DE LA RESISTANCE

Le risque de passage des bactéries résistantes à l'homme est conditionné par plusieurs facteurs propres aux micro-organismes comme, le taux de résistance à un antibiotique pour une espèce bactérienne donnée, la prévalence (nombre de bactéries porteuses de la résistance par rapport au nombre total étudié), l'incidence (variation dans le temps de la prévalence) ou encore la virulence de la bactérie et leur combinaison. A cela s'ajoute le niveau d'exposition des individus aux bactéries résistantes (par contact direct ou indirect *via* la chaîne alimentaire), l'état des défenses immunitaires de l'hôte ou encore l'exposition des individus aux pressions de sélection comme les traitements antibiotiques.

#### III.A. Réservoir de la résistance aux antibiotiques

La flore intestinale de l'homme et des animaux est considérée comme un environnement privilégié en termes de compartiment de sélection et d'amplification des bactéries résistantes et des gènes de résistance (213). D'autres flores commensales comme la flore cutanée, la flore oro-pharyngée, la flore vaginale, sont également exposées au traitement antibiotique. Ces flores bactériennes sont toutefois moins denses que la flore intestinale. Elles sont aussi moins étudiées dans le cadre de la sélection de la résistance aux antibiotiques. Cependant les mécanismes généraux de sélection et d'amplification de la résistance sont comparables dans tous les types de flore.

##### III.A.1. La flore intestinale : un compartiment de sélection

Chez l'homme et chez l'animal, la flore intestinale forme un écosystème complexe avec environ  $10^{14}$  micro-organismes cultivables dont la composition varie en fonction de la localisation dans le tube digestif, de l'individu qui l'héberge et de son âge. L'estomac, le duodénum et l'intestin grêle proximal contiennent peu de bactéries ( $10^3$ - $10^4$  bactéries/ml) pour la plupart des lactobacilles et des streptocoques. Le colon abrite la densité microbienne la plus forte avec  $10^9$ - $10^{11}$  bactéries/ml et une population dominante de bactéries anaérobies strictes composées de 400 à 500 espèces différentes dont *Bacteroides* spp, *Clostridium* spp, *Eubacterium* spp, *Peptostreptococcus* spp et une population sous-dominante de bactéries anaérobies facultatives comme *E. coli* et *Streptococcus* spp (figure 19) (81, 119). Ces micro-

organismes jouent un rôle significatif dans la santé humaine car ils aident à la digestion des aliments, métabolisent les médicaments, produisent des vitamines essentielles et aident à la prévention de la colonisation du tractus gastro-intestinal par des bactéries exogènes. La flore établit des relations multiples avec l'hôte, créant un équilibre dynamique dont la stabilité est maintenue par des interactions partiellement connues. L'acidité gastrique, le péristaltisme intestinal, le système immunitaire participent à cette stabilité. Mais cet écosystème est constamment sollicité par le milieu extérieur, qu'il s'agisse de bactéries exogènes ou de substances alimentaires. Pour se défendre de ces agressions, les bactéries de la flore intestinale assurent un rôle de barrière en s'opposant à l'implantation et à la multiplication des micro-organismes d'origine exogène. Cette lutte à la colonisation est principalement assurée par la flore dominante anaérobie. L'effet drastique de cette barrière provoque une élimination rapide d'une souche exogène tandis qu'un effet permissif permet à une souche exogène de se maintenir, parfois très longtemps, mais à un niveau de population tel qu'elle ne peut s'y développer. Les mécanismes de résistance à la colonisation sont encore mal connus mais font probablement intervenir une compétition entre les micro-organismes pour des substrats tels que les constituants alimentaires ou les mucines, des sites d'adhésion sur la muqueuse intestinale ou encore la production de substances inhibitrices comme les bactériocines ou autres molécules impliquées dans les phénomènes de « quorum sensing » (73, 87, 232).

### III.A.2. Les entérobactéries

Les *Enterobacteriaceae* sont des bacilles à Gram négatif de la flore fécale commensale de l'homme et des animaux. Ce caractère ubiquitaire n'est cependant pas général puisque quelques espèces occupent des niches écologiques précises. Certaines espèces comme *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*, *Citrobacter* ne provoquent pas de pathologies intestinales mais apparaissent fréquemment dans des infections extra-intestinales comme les infections urinaires. Les espèces pathogènes les plus fréquemment isolées dont l'ingestion provoque une infection gastro-intestinale sont *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* et certaines souches d'*Escherichia coli*. En France, ces bactéries pathogènes sont responsables de 35 000 à 49 000 cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Les salmonelles en sont les premières causes avec le recensement de 10 202 cas hospitalisés par an et 535 décès confirmés par

l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) (12). Les infections à *Salmonella* spp se manifeste après une incubation de 6 à 72 h par une gastro-entérite aiguë avec céphalée, douleurs abdominales, nausée vomissement, fièvre. L'évolution est généralement favorable en quelques jours. Cependant cette infection peut évoluer vers une forme septicémique ou localisée. Plus de 2500 sérotypes de salmonelles sont considérés comme pathogènes pour l'homme parmi lesquels on distingue les sérotypes strictement humains Typhi et non-Typhi responsables des fièvres thypoides et paratyphoides, et les sérotypes non typhiques responsables des salmonelloses dites mineures. Les sérotypes de salmonelles non typhiques les plus fréquemment impliqués dans les TIAC collectives sont Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Heidelberg et Hadar. Leur réservoir majoritaire est le règne animal avec parfois un portage asymptomatique par l'animal et certaines préférences selon l'espèce animale. Par exemple les sérotypes Enteritidis, Virchow et Hadar contaminent principalement les volailles comme le poulet, la dinde ou le canard. Le sérotype Dublin et Bovismorbificans infectent surtout les bovins tandis que Derby et Panama sont fréquemment isolés chez le porc (234). Les salmonelles impliquées dans des phénomènes épidémiques, sont universellement reconnues comme des bactéries dites zoonotiques c'est à dire transmissibles à l'homme par le biais de l'alimentation. La transmission à l'homme se fait essentiellement par consommation de produits alimentaires d'origine animale contaminés comme les viandes et particulièrement les volailles, les produits laitiers, les œufs et les produits carnés. Il s'agit le plus souvent d'aliments crus ou peu cuits dont les caractéristiques physico-chimiques permettent la multiplication des salmonelles. Les salmonelloses d'origine alimentaire peuvent donner lieu à des foyers très importants, qui peuvent atteindre une échelle nationale voire internationale si un aliment commercialisé à large diffusion se trouve contaminé. En 1994 aux Etats-Unis, par exemple, une épidémie provoquée par une crème glacée a touché 224 000 personnes. En France, une des plus importantes épidémies, dont la source n'a pu être identifiée, survenue en 1985, aurait touché 25 000 personnes d'après l'estimation la plus faible. Toutefois, la contamination peut également être liée à la transmission directe à partir de l'élevage par portage chez l'animal sain ou à partir de l'environnement proche de l'élevage (12). D'un point de vue général, les entérobactéries telles que *Salmonella* et *E.coli* sont responsables de pertes économiques très importantes liés aux pathologies elles-mêmes, mais aussi aux conséquences des contaminations de la chaîne alimentaire.

### III.B. Prévalence de la résistance aux C3G chez les entérobactéries

Aujourd'hui les conséquences de la résistance aux antibiotiques sont un problème majeur de santé publique avec de lourdes conséquences humaines et socioéconomiques (172). Concernant les infections nosocomiales à entérobactéries, des travaux suggèrent que la résistance accroît le caractère péjoratif du pronostic de l'infection voire augmente la morbidité et la mortalité (118, 126, 195, 205). Dans le cas des salmonelles, il a été observé que la résistance est associée à un risque de bactériémie, de difficultés thérapeutiques, d'hospitalisation et une durée d'hospitalisation plus longue donc plus coûteuse (229).

Dans l'optique de contrôler l'émergence et la dissémination des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, de nombreux programmes de surveillance de la résistance chez l'homme et chez l'animal ont été mis en place sur le plan national et international. Les principaux enjeux de ces réseaux de surveillance concernent la détection des bactéries résistantes émergentes ainsi que le suivi de la diffusion de ces souches susceptibles d'être à l'origine d'échecs thérapeutiques.

Dans ce chapitre, seules les enzymes d'inactivation des C3G considérées comme potentiellement critiques pour la santé animale et humaine seront abordées. Il s'agit des enzymes plasmidiques de classe C (AmpC) telles que CMY et les enzymes de classe A comme les CTX-M (126) (176).

#### III.B.1. En élevage

En médecine vétérinaire les C3G les plus récemment introduites sont la cefquinome et le ceftiofur, administrés en pommade intra-mammaire ou en préparations injectables dont la principale indication est le traitement curatif des infections respiratoires à *Streptococcus* spp, *Pasteurella* spp, *Actinobacillus* spp et *Bacteroides* spp. Cependant, peu de temps après leur introduction, des mécanismes de résistance sont apparus chez *E. coli*, *Klebsiella* et chez des bactéries zoonotiques telles que *Salmonella*.

**Aux Etats-Unis**, entre 1999 et 2003, le NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System) rapporte que parmi les 34 000 souches de *Salmonella* d'origine animale récoltées durant cette période, 10,9 % étaient résistantes au ceftiofur et 0,3% étaient

résistantes au ceftriaxone, une C3G utilisée en médecine humaine (97). Plusieurs études américaines ont rapporté l'origine plasmidique du gène *bla*<sub>CMY</sub> chez ces souches isolées de porcs, de volailles ou encore de bovins (45, 242).

**Au Canada**, d'après les données du réseau CIPARS (Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance) le nombre de *E. coli* résistant au ceftiofur chez le poulet est passé de 16 % en 2003 à 25 % en 2004 (137). Concernant la surveillance de la résistance dans la viande au détail, les résultats affichaient une résistance au ceftiofur chez 34% des souches de *E. coli* et 45 % des souches de *Salmonella* spp. isolées de poulet. Curieusement, la résistance au ceftiofur était corrélée avec la résistance au céfoxitine et au ceftriaxone, suggérant l'implication d'un mécanisme de résistance commun identifié comme étant une production de BLSE de type CMY (137).

**En Europe**, la résistance aux C3G due aux enzymes CTX-M ou CMY est peu observée en élevage (40, 44). Toutefois, en 2003, une alerte a été signalée au Danemark suite à l'identification de souches de *Salmonella enterica* Virchow résistantes aux C3G isolées de cailles importées de France. Depuis 2004, selon le DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial resistance Monitoring and Research Programme), la résistance au ceftiofur n'a pas été détectée chez des souches d'*E. coli* isolées de viande. Seuls quelques isolats furent trouvés (2,6 %) dans du bœuf importé (14). Plus récemment, Wu *et al.* isolèrent au Danemark une souche d'*E. coli* productrice de CTX-M-1 dans de la viande de porc (240). Au Royaume-Uni, les BLSE de type CMY étaient principalement retrouvées chez des souches d'*E. coli* et de *Salmonella* isolées de volaille et de porc (143). En 2006, des souches d'*E. coli* productrices de CTX-M-1, CTX-M-2 et CTX-M-14 ont été isolées de bovins élevés dans le pays-de-Galle et de volailles importées du Brésil, de France et de Pologne (142, 233).

**En France**, la résistance aux antibiotiques chez les bactéries d'origine animale est surveillée selon trois programmes : le réseau « *Salmonella* », le RESAPATH et les plans de surveillances encadrés par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) (13).

- Le réseau « *Salmonella* », animé par l'AFSSA, collecte les données concernant l'ensemble des souches de salmonelles isolées dans des filières de production animale, ainsi qu'au cours de la chaîne alimentaire humaine. Selon les résultats observés entre 2003 et 2004, aucune souche de *Salmonella* résistantes aux C3G n'a été détectée en filière porcine et

bovine (13). Seules quelques souches résistantes au céfotaxime et à la ceftazidime (< 1%) ont été isolées dans les secteurs de « santé et production animale » et « hygiène des aliments » en filière aviaire. La caractérisation moléculaire des souches dont *S. enterica* Virchow a mis en évidence un gène plasmidique codant pour une BLSE de type CTX-M-9 (235).

- La surveillance de l'antibiorésistance des souches pathogènes des filières bovines, porcines et avicoles, est réalisée par le « RESAPATH » (Réseau de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes), initié en 2001 et également animé par l'AFSSA. En 2004, le RESAPATH détecta dans des produits transformés de volaille, de porc et de bovin, des souches de *E. coli* résistantes ou de sensibilité variable au ceftiofur (< 1%). L'identification des mécanismes de résistance a permis de conclure à la présence de gène de type CTX-M-1 et CTX-M-15 (103, 155).

- Des plans de surveillances annuels, mis en place par la DGAL permettent la récolte de souches de *E. coli*, de *Salmonella* spp, d'*Enterococcus faecalis* et de *Campylobacter* spp issues d'abattoirs et de fécès d'animaux sains (15). Parmi les principaux plans de surveillance encadrés par la DGAL, la surveillance de la résistance des bactéries de la flore commensale des animaux a été initiée en 1999 en collaboration avec l'AFSSA. Elle vise à évaluer la résistance des bactéries commensales comme *E. coli* et *E. faecium*, au sein des trois principales filières de production (poulet de chair, porc, bovin). Entre 2003 et 2006, la prévalence des souches d'*E. coli* résistantes aux C3G isolées des différentes filières n'excédait pas les 1% (communication personnelle). Les BLSE responsables du phénotype de résistance ont été identifiées comme des BLSE de type CTX-M et TEM (109).

Il faut noter que les animaux de compagnie et les animaux sauvages représentent un réservoir de bactéries productrices de CTX-M non négligeable. Plusieurs cas ont été rapportés notamment en Europe avec une prédominance des enzymes du type CTX-M-1, CTX-M-9 et CTX-M-15 (147, 181).

### III.B.2. Chez l'homme

Ces dix dernières années, une importante augmentation de la prévalence des entérobactéries d'origine humaine productrices d'enzymes de type CTX-M a été observée

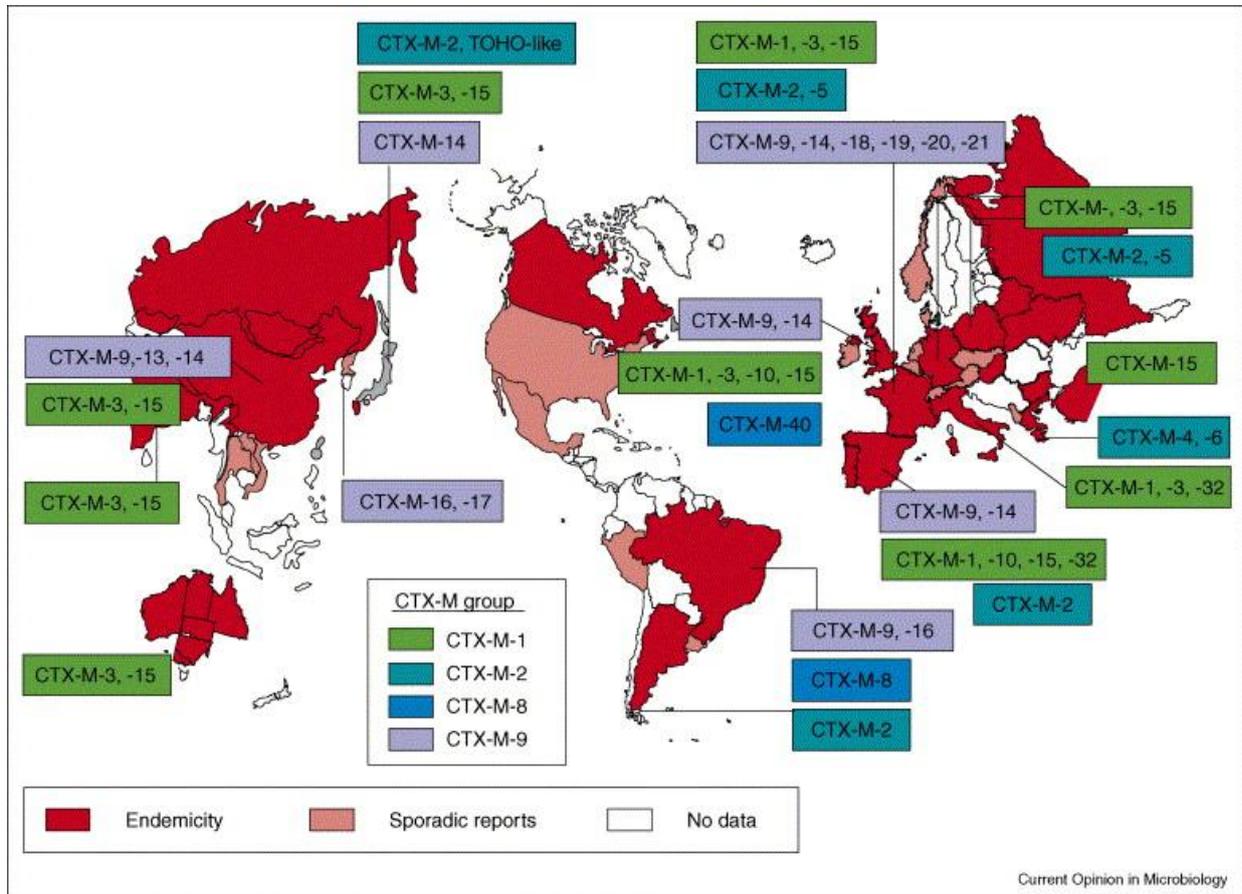


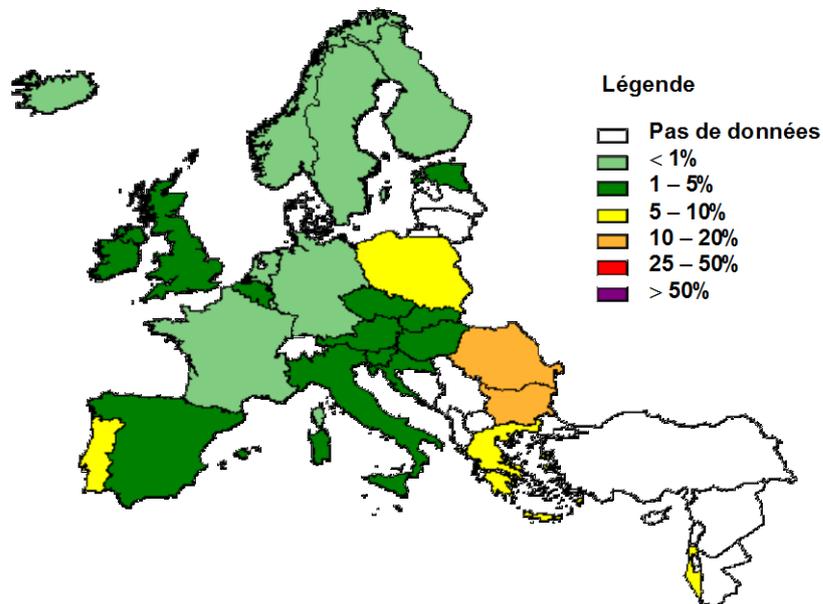
Figure 20. Répartition mondiale des enzymes de type CTX-M issues de cas sporadiques ou endémiques d'après Canton *et al.* (2006).

dans toute l'Europe, en Asie, en Afrique du Nord, en Amérique latine et au Canada (figure 20) (42, 43, 71, 147). Dernièrement, le caractère épidémique mondial de ces enzymes a été confirmé chez des souches d'*E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. et *Morganella morganii* (49, 136). Fréquemment rencontrées lors d'infections à l'hôpital, les CTX-M sont désormais retrouvées dans des infections d'origine communautaire avec comme source majoritaire l'espèce *E. coli* (42, 43, 178).

**Aux Etats-Unis**, le taux de prévalence des salmonelles non-typhiques résistantes aux C3G atteignait 0,4 % en 1996 contre 2,9 % en 2005 (NARMS, 2005). Le mécanisme de résistance fréquemment identifié correspondait à la production d'une enzyme de type CMY-2. La présence du gène *bla*<sub>CMY-2</sub> chez des souches impliquées dans une épidémie à *S. enterica* Newport a également fait l'objet de nombreux articles (45, 190). Ce mécanisme de résistance aux C3G largement détecté chez *Salmonella* semble beaucoup moins identifié chez les souches d'*E. coli* dont la prévalence est de 0,8 % (*n*=1) en 2005 (NARMS, 2005). Jusque dans les années 2007, les enzymes de type CTX-M étaient considérées comme rares, les enzymes prédominantes étant TEM et SHV. Depuis les enzymes CTX-M ont été détectées dans 38,8 % des souches cliniques productrices de BLSE, avec comme déterminants génétiques prédominants, CTX-M-14 et CTX-M-15 (49).

**En Europe**, dans les années 2000, les données issues du réseau de surveillance des salmonelloses humaines « [Enter-net](#) » estimaient à 0.6% la prévalence de la résistance aux C3G et C4G chez *Salmonella enterica* isolées chez l'homme (217, 218). En 2007, l'EARSS ou réseau européen de la résistance aux antibiotiques estimait la résistance aux C3G des *E. coli* comprise entre 1 et 5% en France, en Allemagne, en Pologne, et en Suède ; entre 5 et 10% dans les pays comme l'Espagne, l'Italie et le Royaume-Uni ; voire 25 à 50 % en Turquie et en Roumanie (figure 21). Le mécanisme de résistance aux C3G le plus fréquemment identifié chez ces souches est la production d'enzymes de type CTX-M. En Espagne, les enzymes du groupe CTX-M-9 sont les plus représentées de même que l'enzyme CTX-M-14 fréquemment détectée chez les souches de *E. coli* isolées de patients non-hospitalisés (43). Au Royaume-Uni, aucune souche productrice de CTX-M n'a été rapportée avant les années 2000. Trois ans plus tard, 90 % des souches de *E. coli* isolées de la communauté ou de patients hospitalisés se révélaient productrices de CTX-M-15 et plus rarement de CTX-M-3 ou CTX-M-9 (23, 145, 147).

En 2002



En 2007

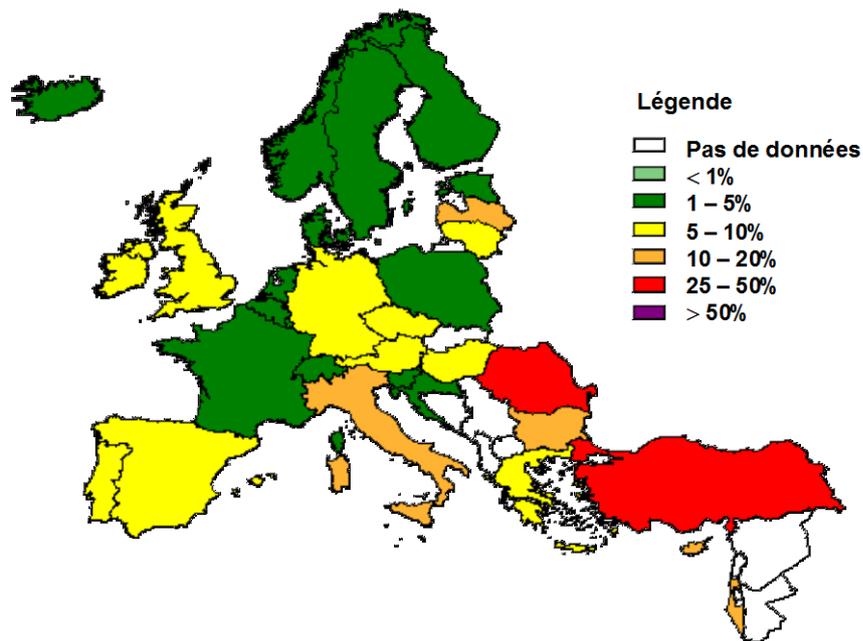


Figure 21. Répartition d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération isolées de prélèvements de sang en 2002 et 2007 (<http://www.rivm.nl/earss>).

**En France**, l'Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) est une association qui fédère 16 réseaux de surveillance de la résistance bactérienne dont la coordination est placée sous l'égide de l'Institut de veille sanitaire (InVS). Ciblée sur des pathogènes spécifiques, la surveillance repose sur le volontariat des laboratoires participants, dans les établissements de santé et en ville. Les différentes données de résistance des principales bactéries isolées d'hémoculture chez des patients hospitalisés proviennent des Centres nationaux de référence (CNR), de réseaux de surveillance hospitaliers ou de ville, et des systèmes d'alerte tels que le signalement des infections nosocomiales. En 2004, 2% des souches d'*E. coli* isolées de bactériémies communautaires et nosocomiales étaient productrices de BLSE alors que cette proportion était seulement de 0,3% en 2001 (169). Il est à noter que 50 à 60% des BLSE isolées à l'hôpital sont produites par des *E. coli* dont le déterminant prédominant de la résistance est l'enzyme CTX-M-15 (82, 126). Les principaux facteurs de risque identifiés dans l'acquisition de ces isolats étaient les infections des voies urinaires, la présence d'un cathéter urinaire chez les diabétiques ou une insuffisance rénale. Plusieurs enzymes de type CTX-M ont également été décrites chez *Klebsiella* et *Enterobacter* dont CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-12, CTX-M-14 (77, 82, 126). Récemment, le CNR- *Salmonella* a isolé une souche de *S. enterica* Virchow humaine productrice de CTX-M-9 (235). Chez ces souches, le gène *bla*<sub>CTX-M</sub> est présent sur des plasmides transférables et coexiste le plus souvent avec d'autres déterminants de la résistance antimicrobienne comme la résistance aux quinolones, posant ainsi le problème d'une possible co-sélection (183). D'autres enzymes d'inactivation des C3G d'origine plasmidique ont été décrites chez *E. coli* et *Salmonella* dont CMY-2, CMY-4, CMY-7 et CMY-11 (156).

### **III.C. Transmission de la résistance à l'homme**

Les bactéries évoluent rapidement non seulement par mutation et multiplication mais également par acquisition de matériel génétique exogène. La résistance par accumulation de mutations est supposée présenter un risque minimum de dissémination des gènes, alors que la résistance par acquisition de gènes exogènes a un fort potentiel de diffusion car elle est dans la plupart des cas portée par des éléments génétiques mobiles. L'absence d'étanchéité entre le

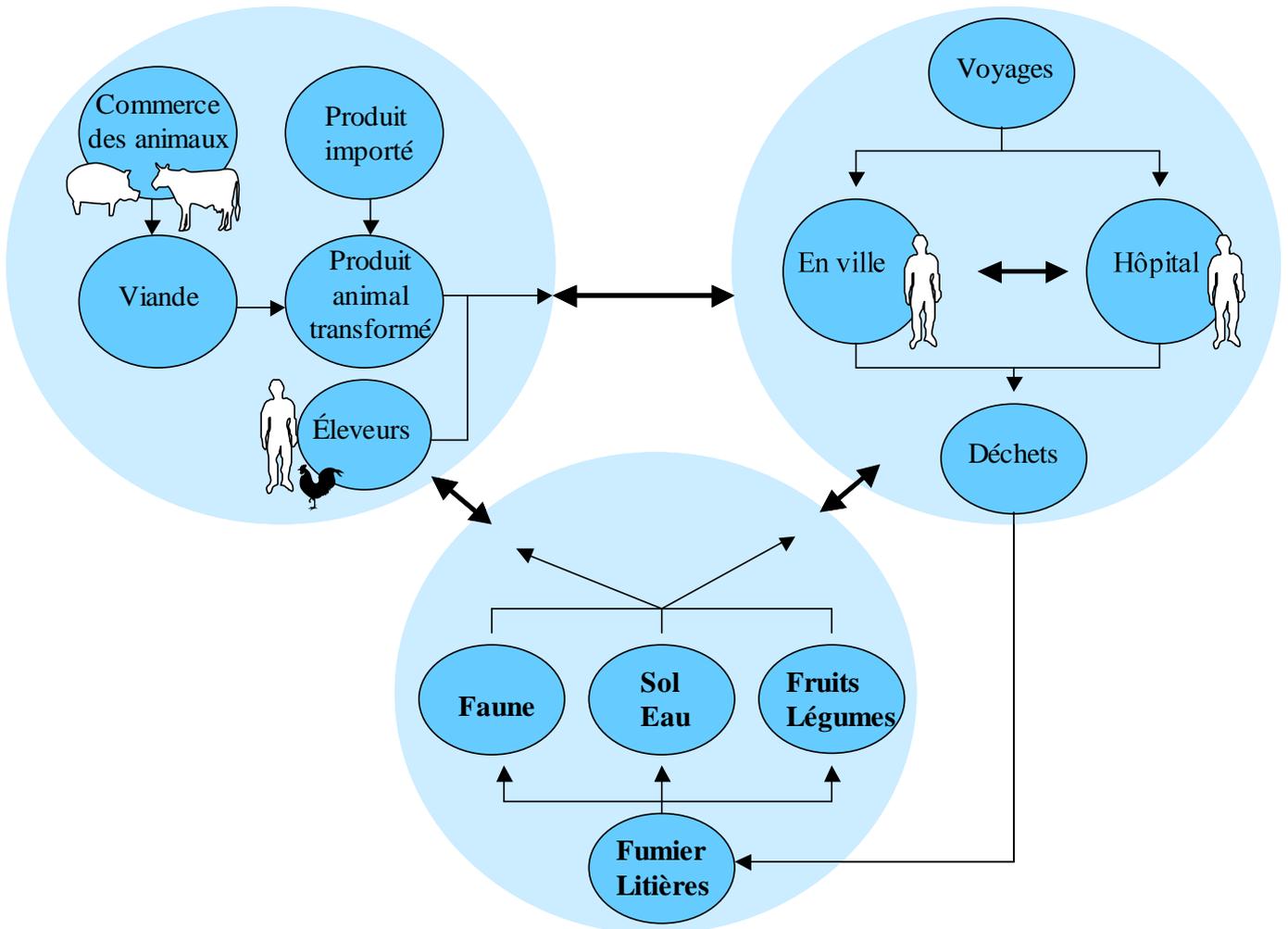


Figure 22. Voie de disséminations potentielles des bactéries résistantes et des gènes de résistance.

les écosystèmes animal - homme - environnement aggrave d'un point de vue santé publique le risque de dissémination de la résistance aux antibiotiques (figure 22).

### III.C.1. La transmission directe

A l'hôpital, l'état immunodéprimé transitoire du patient, ajouté aux traitements antibiotiques peut favoriser la sélection et la colonisation d'un germe infectieux résistant déjà présent chez l'individu (36). A cela s'ajoute la transmission entre patients malades porteurs de souches résistantes (transmission croisée) et le contact direct avec le personnel hospitalier. Cependant, dans un hôpital parisien, le suivi prospectif quotidien des transmissions croisées potentielles aux entérobactéries BLSE a montré une faible participation de la transmission entre patients sur l'augmentation de l'incidence de ce type de souche (104). Les mesures d'hygiène professionnelles mises en place à l'hôpital ont également montré une certaine efficacité à contrôler et limiter la transmission des bactéries en milieu hospitalier. Par exemple, au CHU de Clermont-Ferrand, 228 patients ont été identifiés comme porteurs d'entérocoques multirésistants entre 2004 à 2007 (130). La gestion de l'épidémie recommandée à l'échelle de l'établissement fut la suivante : constitution d'une cellule de suivi, dépistage des patients ayant été en contact avec les patients porteurs du germe, renforcement des mesures d'hygiène, fermeture temporaire de lits dans les chambres doubles, recommandations pour une prescription raisonnée des antibiotiques. Le contrôle de l'épidémie fut effectif au cours du 1<sup>er</sup> semestre 2007. Au CHU de Nantes, une étude réalisée entre 2005 et 2007, a révélé qu'une partie du réservoir responsable de l'augmentation spectaculaire des BLSE en particulier chez *E. coli*, était d'origine communautaire. Même si aucune épidémie n'a été jusqu'à présent rapportée dans cet hôpital, les nouvelles admissions ont été considérées comme un risque potentiel de transmission hospitalière (95). En effet, dans une enquête récente réalisée en Israël, Ben-Ami *et al.* ont montré que 10,8 % des personnes admises à l'hôpital étaient porteuses d'*Enterobacteriaceae* productrices de BLSE en majorité de type CTX-M-2 (53%) (26). Ainsi, l'apport des entérobactéries productrices de BLSE d'origine communautaire contribuerait de manière non négligeable à la diffusion des bactéries résistantes au sein des hôpitaux (26, 225).

Dans la communauté, la circulation des biens, des marchandises et des personnes ainsi que l'absence d'étanchéité entre les écosystèmes sont autant de facteurs pouvant

favoriser la transmission des bactéries résistantes aux antibiotiques. Selon un rapport canadien, 44 % des patients identifiés comme porteur d'une souche d'*E. coli* productrice de BLSE ont été contaminés lors de voyages notamment en Inde, au Moyen-Orient et en Afrique (125). Livermore *et al.* se sont également interrogés sur la circulation mondiale des BLSE de type CTX-M chez l'homme (147). Il semble que les gènes *bla*<sub>CTX-M-3</sub> ont commencé à se répandre en Pologne peu de temps avant que les enzymes de type CTX-M-15 ne deviennent prépondérantes en Europe de l'ouest. Les souches hébergeant *bla*<sub>CTX-M-15</sub> semblent avoir émergées spontanément dans divers pays européens et au Canada (42, 60). Les clones de *E. coli* possédant l'enzyme CTX-M-15 ont probablement été importés de pays avec lesquels l'Europe a des échanges, comme l'Inde et l'Afrique du nord où les CTX-M-15 ont été initialement décrites (161, 182). Récemment, cette relation clonale a été confirmée chez des *E. coli* productrices de CTX-M-15 isolées d'individus séjournant à Paris, Tunis et en Afrique centrale (128). Les mouvements de population entre pays ou continents peuvent contribuer à la dissémination directe des gènes de résistance au sein des populations humaines, néanmoins ils sont loin d'être les seuls mis en cause.

Comme énoncé dans le chapitre précédent, les animaux peuvent héberger des entérobactéries productrices de BLSE (44, 142). En élevage, des enquêtes menées au Pays-Bas montrent que les fréquences de portage intestinal d'entérobactéries résistantes à différentes classes d'antibiotiques et d'entérocoques résistants aux glycopeptides sont significativement plus élevées chez les sujets travaillant dans les élevages que chez les individus résidant en zone urbaine (162, 226, 228). En France, Aubry *et al.* signalèrent également une association significative entre la production porcine et l'isolement de bactéries commensales résistantes chez les éleveurs de cette filière (17). Bien que très peu documenté, les animaux de compagnies sont également porteurs de bactéries résistantes notamment par production de BLSE (210). Ainsi, il est tout à fait envisageable que les sujets ayant des contacts répétés avec les animaux de compagnie porteurs de bactéries résistantes aient une probabilité d'être porteurs eux-mêmes de bactéries résistantes.

### III.C.2. La transmission *via* l'alimentation d'origine animale

Le rôle de la chaîne alimentaire dans la transmission de bactéries résistantes est non seulement possible mais certains arguments attestent de sa réalité pour certains pathogènes

comme *Salmonella*. De nombreux rapports notent effectivement la présence de bactéries productrices de CTX-M dans l'alimentation d'origine animale (2, 44). En 2004, à la suite d'une épidémie à salmonelle survenue en France, une étude de cas identifia que les malades infectés par *Salmonella enterica* Newport résistant à la ceftriaxone avaient consommé de la viande de cheval importée hébergeant une souche de *S. enterica* Newport véhiculant le gène de résistance *bla*<sub>CMY-2</sub> (84, 85). Plus récemment, Lavilla *et al.* rapportèrent que les aliments d'origine animale pouvaient être un vecteur de la résistance à BLSE. En effet, parmi 10 foyers épidémiques de gastro-entérites d'origine alimentaire étudiés en Espagne, deux à plusieurs convives partageaient la même souche productrice de BLSE (127). Une épidémie à *S. enterica* Newport productrice de BLSE de type CMY-2 est également survenue aux Etats-Unis en 2002 (186, 241). La caractérisation des souches isolées à l'hôpital et chez des animaux d'élevage montre que certaines souches d'origine humaine et animale avaient des profils électrophorétiques identiques (242). En France, le réseau « *Salmonella* » a montré que sur les souches isolées entre 2002-2003, 8 souches de *S. enterica* Virchow d'origine aviaire et une d'origine humaine (prélèvement fécal) étaient toutes productrices du déterminant CTX-M-9 (235). La caractérisation moléculaire de ces souches a permis de montrer que toutes présentaient des profils de macrorestriction proches (94 % de similarité) laissant supposer que celles-ci étaient fortement liées. Ce gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> est localisé sur un plasmide conjugatif transférable à *E. coli*. Les profils de restrictions *EcoR*I obtenus après une digestion des plasmides de 6 des transconjugants étudiés présentaient de forte similarité aussi bien entre les transconjugants issus des isolats d'origine animale qu'humaine.

### III.C.3. Le transfert de gène de résistance de l'animal à l'homme

Même si l'origine animale d'une toxi-infection alimentaire à bactéries résistantes aux antibiotiques est facile à mettre en évidence chez l'homme, l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal des bactéries d'origine animale aux bactéries d'origine humaine est plus complexe à démontrer. Les principaux rapports épidémiologiques recensent la présence de plasmides conjugatifs communs à plusieurs souches résistantes retrouvées aussi bien chez l'homme que chez l'animal, suggérant un potentiel transfert de plasmides porteurs de résistance entre l'homme et l'animal (30, 235, 238, 239). D'autres auteurs ont rapporté l'existence de déterminants de résistance communs chez des bactéries isolées chez

Tableau 10. Exemples de transfert conjugatif *in vivo* chez des bactéries à Gram négatif et Gram positif

Souche donneuse	Souche réceptrice	Modèle animal et environnement intestinal	Plasmide conjugatif, transposon ou gène de résistance	Traitement antibiotique	Références
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	Souris-St	pR1drd19	Tétracycline	(Licht <i>et al.</i> , 1999)
			pRP4	Erythromycine	(Licht <i>et al.</i> , 2003)
		Souris axénique, souris-FIH traitée à l'érythromycine	pIP1100		(Andremont <i>et al.</i> , 1985)
		Poulet de chair	Tn21	Flavophospholipol	(Poole <i>et al.</i> , 2006)
		Poulet et souris conventionnelle	ND	Tétracycline	(Hart <i>et al.</i> , 2006)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i> Newport	Rat-FIH, rat-FIR, rat-FIP	ND		(Nijsten <i>et al.</i> , 1995)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i> Newport	Poulet	<i>cmy-2</i>	Ceftiofur	(Poppe <i>et al.</i> , 2005)
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Rat axénique	Tn916	Tétracycline	(Bahl <i>et al.</i> , 2004)
		Souris-Sp	pCGC		(Coburn <i>et al.</i> , 2007)
<i>E. faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Souris axénique	Tn1545	Tétracycline	(Doucet-Populaire <i>et al.</i> , 1991)
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	Souris axénique	<i>vanA</i> et <i>vanB</i>		(Dahl <i>et al.</i> , 2007)
		Souris-St	Tn5405		(Lester <i>et al.</i> , 2004)
		Souris axénique	<i>vanA</i>		(Johnsen <i>et al.</i> , 2002)
		Souris axénique	<i>vanA</i>	Tylosine	(Moubareck <i>et al.</i> , 2003)
		Homme	<i>vanA</i>		(Lester <i>et al.</i> , 2006)
		Souris-FIH exempte d'entérocoques	<i>vanA</i>		(Mater <i>et al.</i> , 2005)
		Souris axénique et souris-FIH	<i>vanA</i>		(Bourgeois <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>E. faecalis</i>	Rat axénique et souris-St	pLFE1	Erythromycine, streptomycine	(Feld <i>et al.</i> , 2008)
		Souris axénique	pAMβ1	Erythromycine	(Morelli <i>et al.</i> , 1988)
		Rat axénique	<i>tetM</i> et <i>ermB</i>		(Jacobsen <i>et al.</i> , 2006)
<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>E. faecalis</i>	Souris axénique	Tn1549	Vancomycine	(Launay <i>et al.</i> , 2006)
<i>Shigella</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i>	<i>Shigella</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i>	Souris axénique et conventionnelle	ND	Erythromycine, streptomycine	(Kasuya, 1964)
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	Poulet	<i>tetO</i>		(Avrain <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	Souris axénique	pIL205, pIL252, pIL253, pMS1.5B		(Gruzza <i>et al.</i> , 1993)
	<i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Peptostreptococcus</i>	Souris axénique	pIL205, pIL253		(Gruzza <i>et al.</i> , 1994)
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>E. coli</i>	Souris axénique et souris-FIH	pYD1	Ampicilline	(Duval-Iflah <i>et al.</i> , 1980)

St : streptomycine ; Sp : spectinomycine ; FIH: flore intestinale humaine ; FIR : flore intestinale de rat ; FIP : flore intestinale de porc ; ND : non déterminé

l'homme et l'animal. Winokur *et al.* détectèrent également la présence du gène *bla*<sub>CMY-2</sub> porté par un plasmide dans des souches d'*E. coli* et de *Salmonella* d'origine animale et humaine (239). Bien que les souches fussent phylogénétiquement différentes, le plasmide hébergeant le gène *bla*<sub>CMY-2</sub> était commun aux souches d'origine animale et humaine. Dans le cas des gènes de résistance aux glycopeptides, le gène *vanA*, porté par l'élément transposable Tn1546-like, a été retrouvé chez des entérocoques d'origine animale et humaine ayant le même génotype de restriction mais aussi chez des souches de génotypes de restriction différents suggérant que la dissémination de ce transposon était plus fréquente que la dissémination des souches porteuses de la résistance (100).

*In vivo*, les modèles animaux couramment utilisés pour détecter le transfert de gènes de résistance au sein de la flore intestinale sont les rongeurs axéniques ou les rongeurs à flore contrôlée. Ces modèles ont permis de mettre en évidence le transfert de gènes de résistance entre des souches d'origine animale susceptibles de se retrouver dans l'alimentation comme *E. coli*, *E. faecium*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus spp* et *Campylobacter spp*, et les bactéries d'origine humaine (tableau 10). Ces auteurs établissent une corrélation entre les plasmides issus des souches donneuses d'origine animale et les plasmides retrouvés chez les souches de la flore dites transconjugants, c'est-à-dire les souches ayant acquis le plasmide par conjugaison. Bahl *et al.* ont montré par exemple l'existence d'un transfert du transposon conjugatif Tn916 issu d'*E. faecalis* d'origine animale aux souches d'*E. faecalis* présentes dans le tractus digestif de rats gnotobiotiques (19). Plus récemment, Lester *et al.* ont observé qu'un gène de résistance à la vancomycine pouvait se retrouver chez les entérocoques endogènes de la flore fécale de volontaires humains ayant ingéré un *E. faecium* porteur de ce gène *vanA* (132). Le transfert conjugatif du gène *bla*<sub>CMY-2</sub> a également été mis en évidence dans un modèle de volaille entre une souche donneuse *E. coli* et une souche receveuse *S. enterica* Newport. Cette dissémination a également été détectée chez d'autres sérotypes de *E. coli*, endogènes de l'intestin des animaux (185).

Ainsi, la présence de gènes de résistance sur des éléments transférables tels que les transposons accroît la mobilité des gènes et donc le risque de diffusion de la résistance de l'animal à l'homme. La flore intestinale de l'homme constituerait ainsi un important réservoir de gènes de résistance susceptibles de transférer aux bactéries pathogènes (2, 9, 32, 134, 135, 227).

### III.D. Impact d'une pression de sélection

#### III.D.1. Impact d'un antibiotique sur l'écosystème intestinal et la résistance

Lors d'une antibiothérapie ou d'un traitement prophylactique, la fraction de la dose administrée qui est excrétée sous forme active par voie biliaire ou sécrétée par la muqueuse intestinale, à laquelle s'ajoute, en cas d'administration orale, la fraction non absorbée, peut suffire à altérer l'équilibre écologique de la flore de barrière et une élimination des bactéries sensibles. Les bactéries commensales de la flore intestinale sont largement exposées aux agents antimicrobiens administrés par voie orale ou encore administrés par voie parentérale. L'impact du traitement antibiotique sur la flore bactérienne dépend de nombreux facteurs que sont le spectre de l'antibiotique, la dose, la voie d'administration, ses propriétés PK-PD et sa capacité à être inactivé *in vivo* (213). En effet, lorsque les concentrations d'antibiotiques atteintes dans la lumière intestinale dépassent les concentrations minimales inhibitrices pour les bactéries de la flore, la colonisation et l'implantation dans le tractus digestif des micro-organismes exogènes résistants seront favorisées. Cela peut entraîner de lourdes conséquences comme la translocation de la bactérie de la lumière intestinale aux ganglions mésentériques et éventuellement à d'autres organes (54, 119). Doré *et al.* suggéraient ainsi que les probabilités d'infection par une bactérie pathogène étaient alors multipliées par trois lorsque l'individu était traité par un antibiotique (22, 74). Chez l'homme, les différents germes critiques sont les bactéries à l'origine des infections zoonotiques (*Campylobacter*, *Salmonella*), des infections nosocomiales (entérocoques, entérobactéries, staphylocoques) et des infections communautaires non zoonotiques (streptocoques, pneumocoques). Ces micro-organismes peuvent être responsables d'infections graves. Plus grave encore, la pression de sélection peut favoriser la sélection et la prolifération de souches résistantes au sein de la flore endogène (22, 32, 72). En effet, des études ont montré que chez l'adulte, l'administration de ceftazidime entraînait l'élimination des populations d'entérobactéries commensales tout en favorisant la croissance de bactéries résistantes comme *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE ou *Enterobacter* spp, hyperproducteur de céphalosporinase chromosomique (188, 189). A Taiwan, un cas d'échec thérapeutique dû à la présence de souches de *S. enterica* Anatum et *E. coli* résistantes à la ceftriaxone a été étudié (212). *S. enterica* Anatum et *E. coli* initialement sensibles à l'antibiotique avaient été isolées d'un patient hospitalisé pour le traitement d'une infection urinaire. Deux semaines après le début

du traitement à la ceftriaxone, les deux souches isolées des urines du patient étaient résistantes à la ceftriaxone par production de BLSE de type CTX-M-3. La caractérisation des souches permit d'établir que l'émergence de la résistance à la ceftriaxone chez *E. coli* et *S. enterica* Anatum était due à l'acquisition *in vivo* d'un plasmide conjugatif contenant le gène *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. Le patient est décédé d'une septicémie. L'origine (transmission par contact direct ou indirect) du plasmide n'a pas été identifiée (212).

### III.D.2. Impact d'un antibiotique sur le transfert de gène de résistance

De nombreuses études sur le transfert conjugatif de bactéries à Gram négatif et positif avec ou sans pression de sélection ont fait l'objet de tests *in vivo* récapitulés dans le tableau 10. La présence d'antimicrobiens procure un avantage sélectif aux bactéries portant des gènes de résistance vis-à-vis des souches sensibles. La colonisation et la persistance des souches donneuses ne sont pas un pré-requis pour les échanges génétiques. Une souche donneuse, même transitée, est capable de transférer ses gènes aux bactéries de la flore intestinale (105, 106, 113, 139). Dans le cas des entérocoques naturellement présents dans la flore intestinale humaine, le transfert des transposons conjugatifs Tn916-Tn1545 portant le gène de résistance à la tétracycline chez *E. faecalis*, est connu pour être plus efficace en présence de cet antibiotique. En effet, la tétracycline, un antibiotique bactériostatique, inhibe la croissance bactérienne et procure des conditions optimales pour l'implantation des souches résistantes donneuses et des transconjugants. Ainsi il a été mis en évidence dans des modèles d'animaux axéniques, que la présence de tétracycline dans l'intestin augmentait le niveau de population des souches ayant acquis le transposon Tn916-Tn1545 (19, 75). Selon Moubareck *et al.*, le transfert du gène *vanA* d'*E. faecium* d'origine animale à *E. faecium* d'origine humaine pouvait être favorisé par la présence de concentrations sub-inhibitrices de tylosine dans un modèle de souris axéniques (158). Toutefois, chez la volaille, le traitement au ceftiofur ne permit pas d'observer une augmentation du transfert du gène de résistance *bla*<sub>CMY-2</sub> entre *E. coli* et *S. enterica* Newport dans le tractus digestif (185). D'autres antibiotiques comme l'ampicilline, la vancomycine et l'érythromycine, ont montré leur influence sur la transmission des gènes de résistance. Néanmoins, peu d'études montrent clairement si la présence d'antibiotique favorise la prolifération initiale des bactéries ayant acquis la résistance ou bien si elle augmente le taux de transfert des gènes de résistance.

*PROBLEMATIQUE ET  
OBJECTIFS*

Actuellement, les  $\beta$ -lactamines dont les céphalosporines de troisième génération sont parmi les antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine. Les C3G sont prescrites pour le traitement individuel des infections graves causées par des pathogènes Gram-négatif tels que *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Salmonella* spp.. Cependant peu de temps après leur introduction sur le marché, des bactéries résistantes aux C3G par production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) ont été décrites. Jusqu'à la fin des années 1990, les TEM et SHV étaient les principaux types de BLSE. Depuis, de nouvelles enzymes ont été identifiées. Désormais, les CTX-M sont, à l'échelle mondiale, les BLSE majoritairement isolées chez les micro-organismes à Gram négatif d'origine clinique. Cette rapide progression s'explique par de nombreux facteurs que sont l'exposition aux antibiotiques des individus, la possibilité de transmission des bactéries résistantes parmi les individus mais également l'aptitude intrinsèque de la bactérie résistante à se transmettre lors d'un contact entre deux individus. De plus, la présence des gènes de résistance aux C3G sur des éléments génétiques mobiles accroît le potentiel de dissémination de ces gènes intra et inter-espèce bactériennes. De nombreux arguments attestent de l'absence d'étanchéité absolue entre les divers mondes bactériens (gènes de résistance communs entre l'animal et l'homme). De ce fait, le transfert de gènes de résistance de bactéries d'origine animale à celles d'origine humaine, et réciproquement, semble biologiquement plausible. A l'heure actuelle, l'évaluation et la quantification de ces flux de gènes entre les populations bactériennes humaines et animales ne sont peu ou pas réalisées.

Dans ce contexte, notre premier objectif a été de confirmer l'existence du transfert d'un gène de résistance aux C3G (CTX-M-9) entre une souche d'origine animale, *S. enterica* Virchow résistante aux C3G, et une entérobactérie de type *E. coli* dans des conditions de laboratoire. Ce test *in vitro* utilisé pour confirmer la transférabilité des gènes de résistance présente cependant quelques limites comme l'absence de facteurs environnementaux (système immunitaire, protéines, mouvements péristaltiques, flux gastrique...etc.) susceptibles d'influencer le transfert de gènes. Pour compléter les données *in vitro*, la mobilité de ce gène de résistance et l'influence d'un traitement thérapeutique à C3G ont été testés dans un modèle animal simple, le rat axénique. Dépourvus de tous germes, les rats axéniques ont été colonisés par la souche donneuse *S. enterica* Virchow et la souche réceptrice *E. coli* puis traités ou non avec une C3G (Article 1). Afin d'évaluer les probabilités de transfert de ce gène dans une flore plus complexe, des rats axéniques ont été

inoculés avec une flore intestinale humaine et les modulations du transfert ont été évaluées sous pression de sélection (Article 2). Le choix du céfixime comme céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération repose essentiellement sur ses propriétés pharmacologiques combinées aux essais analytiques et bactériologiques réalisés lors d'études préliminaires au laboratoire. La relation entre la biodisponibilité du céfixime et le transfert de gènes de résistance a été établie lors d'une étude pharmacocinétique/pharmacodynamique (Article 3).

# *RESULTATS*

## ARTICLE 1

**Impact d'un traitement au céfixime sur le transfert du gène de résistance  $bla_{CTX-M-9}$  de *Salmonella enterica* Virchow à *Escherichia coli* dans des rats gnotobiotiques**

*Applied and Environmental Microbiology*

## OBJECTIFS

L'objectif de cette étude était d'évaluer *in vitro* versus *in vivo*, le transfert du gène de résistance *bla*<sub>CTX-M-9</sub> entre une souche d'origine animale, *S. enterica* Virchow, et une souche commensale, *E. coli*, avec et sans pression de sélection au céfixime.

## MATERIELS ET METHODES

La souche donneuse *S. enterica* Virchow 3464b est sensible à la rifampicine et résistante à la streptomycine, la spectinomycine, la tétracycline, le triméthoprime, les sulfonamides et l'acide nalidixique. Elle porte un gène plasmidique *bla*<sub>CTX-M-9</sub> lui conférant une résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) dont le céfixime. La souche *Escherichia coli* J5 sensible aux C3G, est utilisée comme souche réceptrice. *In vitro*, les probabilités de transfert entre ces 2 souches ont été évaluées par des tests de conjugaison. *In vivo*, 2 groupes de 5 rats axéniques ont reçu par voie orale la souche d'*E. coli* J5 suivi de la souche *S. enterica* Virchow à 7 jours d'intervalle (Annexe 1). Une semaine après l'administration de la souche donneuse, un groupe de rats est traité *per os* à la dose de 4 mg/kg de céfixime, deux fois par jour à 8h d'intervalle pendant 8 jours. Le groupe témoin reçoit de l'eau stérile. L'apparition de la souche donneuse, de la souche réceptrice et des transconjugants est mesurée dans les fécès des rats, pendant et après le traitement, par des dénombrements sur milieux sélectifs. Seize transconjugants sont prélevés puis confirmés comme étant des *E. coli* par l'amplification du gène *uidA*. La présence du gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> est vérifiée par PCR chez tous les transconjugants. La sensibilité des souches vis-à-vis de différents antibiotiques (céfixime, amoxicilline/ acide clavulanique, céfotaxime, céfoxitine, ceftazidime, ceftiofur, céfuroxime, acide nalidixique, streptomycine, sulfaméthoxazole, tétracycline, triméthoprime et triméthoprime/sulfaméthoxazole) est mesurée par E-test ou par des microplaques d'antibiotiques déshydratés. Les concentrations fécales de céfixime chez tous les rats traités sont déterminées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-MS).

## RESULTATS

Le transfert du plasmide portant le gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> entre *S. enterica* Virchow à *E. coli* a été confirmé *in vitro* avec une fréquence de transfert de l'ordre de  $\sim 10^{-8}$  transconjugants / donneurs. *In vivo*, le nombre de transconjugants était plus élevé que *in vitro*. La fréquence de

transfert était de  $\sim 10^{-5}$  transconjugants / donneurs dans le groupe contrôle. En présence de céfixime, une diminution du niveau de population des *E. coli* et des tranconjugants d'un facteur 4000 était observée dès le premier jour de traitement. En revanche, la souche de *S. enterica* Virchow semblait moins affectée par le traitement au céfixime avec une diminution du niveau de population de seulement 200 fois dès le premier jour de traitement. La concentration fécale moyenne de céfixime pendant les 8 jours de traitement était de 37.2 mg/kg de fécès. Douze jours après l'arrêt du traitement, les différentes populations bactériennes atteignaient des niveaux de concentrations comparables au groupe témoin. A la fin de l'expérimentation, le ratio de transconjugants par donneurs était de  $\sim 10^{-5}$  dans les deux groupes. Parmi les transconjugants obtenus *in vitro* et *in vivo*, un cotransfert des gènes de résistances pour la streptomycine, le sulphaméthoxazole, la tétracycline et le triméthoprimé n'a été observé que chez les transconjugants obtenus *in vitro*.

## CONCLUSION

Ces résultats montrent que le transfert *in vitro* sous-estime le potentiel de transfert dans le tractus digestif des rats dixéniques. Nos résultats indiquent également que le transfert du gène *bla<sub>CTX-M-9</sub>* a eu lieu *in vivo*, mais n'a pas été renforcé par le céfixime à des doses thérapeutiques. Compte tenu du risque pour l'homme de la présence de souches résistantes dans le tube digestif, la diffusion des gènes de résistance doit être confirmée dans un modèle plus complexe tel que des rats associés avec une flore humaine.

## Impact of Therapeutic Treatment with $\beta$ -Lactam on Transfer of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> Resistance Gene from *Salmonella enterica* Serovar Virchow to *Escherichia coli* in Gnotobiotic Rats<sup>∇</sup>

Stéphanie Faure, Agnès Perrin-Guyomard,\* Jean-Michel Delmas, and Michel Laurentie

Laboratory for the Research and Investigation of Veterinary Drugs and Disinfectants, Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Unit, AFSSA Fougeres, BP 90203, La Haute Marche, 35133 Javene, France

Received 6 January 2009/Accepted 20 June 2009

The conjugative transfer of the plasmid carrying the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene from *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from a chicken farm to a recipient *Escherichia coli* strain was evaluated in vitro and in axenic rats inoculated with both strains, with or without selective pressure due to therapeutic doses of cefixime. The transfer of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene of *S. enterica* serovar Virchow to *E. coli* was confirmed in vitro, at a low frequency of  $5.9 \times 10^{-8}$  transconjugants/donors. This transfer rate was higher in gnotobiotic rats and reached  $\sim 10^{-5}$  transconjugants/donors without selective pressure. This frequency was not affected by the addition of therapeutic doses of cefixime. Thus, estimates of in vitro transfer underestimated potential transfer in the digestive tract, and therapeutic doses of cefixime did not increase the selection for transconjugants.

$\beta$ -Lactams and extended-spectrum cephalosporins are widely used in human and veterinary medicine to treat severe infections in humans and animals caused by *Enterobacteriaceae* and other gram-negative pathogens (7). However, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) have emerged and become the major mechanism of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Until the late 1990s, TEM and SHV enzymes were the predominant ESBLs. However, over the last decade, CTX-M-type enzymes have become the most prevalent extended-spectrum  $\beta$ -lactamases worldwide. Currently, there have been a number of reports documenting an increasing prevalence of enteric pathogens that produce these plasmid-mediated CTX-M enzymes (4, 8, 9, 39).

Although originally confined to hospitals, ESBL-producing strains are now emerging in the community. Several investigations have shown that the rate of fecal carriage of ESBL-positive isolates (especially *Escherichia coli*) in humans is increasing, with CTX-M type enzymes found in most isolates (14, 17, 25, 28, 30, 36). This alarming phenomenon may have serious economic consequences and implications for treatment.

*bla*<sub>CTX-M</sub> genes spread throughout the community, mostly through the transmission of plasmids, and some studies have reported that animals may serve as a possible source for the dissemination of ESBL-encoding genes to humans. Indeed, common conjugative resistance plasmids and resistant clones have been found in animals, food products, and humans, suggesting that the transfer of extended-spectrum cephalosporin resistance between animals and humans is possible (17, 18, 21, 31, 40).

In France, the emergence of the CTX-M-9 enzyme in *Salmonella enterica* serovar Virchow strains recovered from poultry, poultry products, and one human patient was reported between

2002 and 2003 (5, 31, 38, 40, 41). A comparative analysis of the *bla*<sub>CTX-M-2</sub> and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> plasmids from *S. enterica* serovar Virchow isolates from human and poultry sources demonstrated a close relationship between the plasmids (16).

To examine the hypothesis that antimicrobial resistance in humans could partly be attributed to food products, a number of studies have investigated the transfer of antibiotic resistance from bacteria originating in animal hosts or food products. Previously, Lester et al. (24) demonstrated the transfer of the *vanA* resistance gene from *Enterococcus faecium* isolated from animals to *E. faecium* isolated from human volunteers during transient intestinal colonization in humans in the absence of selective pressure. In a gnotobiotic mouse model, Feld et al. demonstrated the evidence of spread of a small plasmid pLFE1 harboring the erythromycin-resistant gene *erm*(B) from *Lactobacillus plantarum* isolated from raw-milk cheese to exogenous *Enterococcus faecalis* inoculated into the intestinal flora of mice (16). The transfer rate was enhanced when erythromycin was coadministered. Improvements in our understanding of the in vivo transmissibility and stability of antimicrobial resistance markers and the mechanisms driving horizontal transmission may help to predict the outcome of different strategies for controlling epidemic plasmids.

The aim of the present study was to determine whether the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> resistance gene could be transferred from an animal *S. enterica* serovar Virchow strain to a commensal *E. coli* strain that originated from the human intestinal tract while under selective pressure from a therapeutic dose of  $\beta$ -lactam. The transfer was investigated by using in vitro mating and a germfree rat model. We also evaluated the impact of the concentration of cefixime, an expanded-spectrum cephalosporin, on the transfer rate.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and culture media.** The donor strain used in the transfer experiment was *S. enterica* serovar Virchow 3464b, isolated from a chicken farm (40). This strain is resistant to streptomycin, spectinomycin, tetracycline, trimethoprim, sulfonamides, and nalidixic acid and carries the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> resis-

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratory for the Research and Investigation of Veterinary Drugs and Disinfectants, Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Unit, AFSSA Fougeres, BP 90203, La Haute Marche, 35133 Javene, France. Phone: 33(2) 99-94-78-78. Fax: 33(2) 99-94-78-80. E-mail: a.perrin-guyomard@afssa.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 6 July 2009.

tance gene. The *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene encodes the CTX-M-9 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and is found on a single plasmid (p3464b) larger than 126 kb (40). The recipient *Escherichia coli* J5 strain is resistant to rifampin (rifampicin; MIC  $\leq$  250  $\mu$ g/ml) and susceptible to extended-spectrum cephalosporins, including cefixime. Bacterial strains were cultured in brain heart infusion (BHI) broth or agar (AES, Bruz, France) for 18 h (stationary phase) at 37°C. For the in vitro and in vivo transfer experiment, different selective media were used to select and enumerate the donor, recipient, and transconjugant strains. Donor strains were enumerated on Brilliant Green agar (Difco/BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) supplemented with 4  $\mu$ g of cefixime trihydrate (ytterbium III ionophore I; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)/ml. Recipient strains were counted on Drigalski lactose agar (Fisher-Bioblock Scientific, Illkirch, France) supplemented with 250  $\mu$ g/ml of rifampin (Sigma-Aldrich). *E. coli* J5(p3464b) transconjugants were counted on Drigalski lactose agar supplemented with cefixime (4  $\mu$ g/ml) and rifampin (250  $\mu$ g/ml).

**In vitro mating.** Transferability of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene between *S. enterica* serovar Virchow and *E. coli* J5 was studied first in three conjugation experiment procedures: (i) in vitro filter mating, (ii) in vitro mating on agar plate without a filter, and (iii) in vitro mating in liquid media. Procedure 2, showing a higher transfer frequency (data not shown), was used to determine the conjugation rate in the following experiments, as described below. One colony of donor and recipient strains was inoculated separately in BHI broth and grown overnight at 37°C. Recipient and donor cultures were diluted 10-fold with fresh BHI broth. The donor strain was cultured at 37°C until it reached the mid-exponential-growth phase (optical density at 600 nm = 0.7), and 1 ml of the donor and 1 ml of the recipient strain were mixed. An aliquot of the mating mixture (200  $\mu$ l) was spread on the surface of a BHI agar plate. After 24 h of incubation at 37°C, the cells were suspended in 1 ml of BHI broth. A series of 10-fold dilutions of the mating mixture was prepared, and 200- $\mu$ l aliquots of each dilution were plated on a selective medium. The colonies on the plates were counted after 24 h of incubation at 37°C. Transfer frequencies were calculated by dividing the number of transconjugants by the number of donor colonies. The geometric mean transfer frequencies were calculated from five independent conjugation experiments to represent the ratio of transconjugants per donor.

**In vivo mating.** The animal experiments were approved and conducted in accordance with French national legislation. Ten female germfree Oncin France strain A rats (Charles River, Arbresle, France) were transferred after their arrival into a sterile Trexler-type plastic film isolator (Esi Flufrance, Massy, France) and randomly assigned to two groups of five animals. Each group was kept in a separate isolator, and each rat was caged individually. The germfree status of the rats was checked and confirmed immediately after their reception and introduction into the isolator and during the period of acclimatization, by culturing fecal samples to test for the aerobic and anaerobic growth of bacteria and yeast. The animals were provided with ad libitum access to a commercial sterilized diet and given ad libitum autoclaved drinking water. The axenic rats were 5 weeks old at the beginning of the experiment. On day 0, all rats were inoculated intragastrically by gavage with 1 ml of an  $\sim 10^9$ -CFU/ml suspension of the recipient strain *E. coli* J5. One week later, once the establishment of the recipient strain had been demonstrated by recipient strain enumeration as previously described, rats received 1 ml of an  $\sim 10^8$ -CFU/ml suspension of the donor strain *S. enterica* serovar Virchow 3464b intragastrically. On day 14 after inoculation of *E. coli* J5, five animals were treated orally with cefixime trihydrate (Oroken, 100 mg; Sanofi-Aventis, Paris, France) (4 mg/kg) in water twice daily for 8 days. The antibiotic was reconstituted according to the manufacturer's instructions by adding sterile water to obtain a concentration of 20 g/liter and stored at 21°C for 1 week. The control group of five animals received drug-free water by gavage. Fresh fecal samples were collected from each rat by provoked defecation on days 0, 1, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 27, 29, 31, and 34. The samples were homogenized by whirly mixing in sterile water (10%). Serial 10-fold dilutions were prepared in 0.9% NaCl and spread, as described under the "bacterial strains and culture media" subheading, onto appropriate media within dishes supplemented with antibiotics using the automated spiral plater (Inter-science, Paris, France). The detection limit of this procedure was  $\sim 10^2$  CFU/g of feces.

Three isolates growing on Drigalski lactose agar containing cefixime and rifampin were arbitrarily isolated from each rat during the experiment at days 14, 27, 31, and 34. Altogether, 60 isolates with resistance phenotype *E. coli* J5(p3464b) transconjugant were confirmed as *E. coli* by PCR amplification of the *iudA* gene, as described by Bej et al. (2, 3). Sample DNA preparations were obtained by adding the InstaGene matrix kit (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) to the bacterial suspension, according to the manufacturer's instructions. Supernatant (5  $\mu$ l) was used as a template for the PCR.

Plasmid DNA was isolated from 12 transconjugants (representing four rats and 3 days of the study) by using a QIAprep Spin Midiprep Kit (Qiagen, Hilden,

Germany). PCR assays, using primers targeting the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene, were carried out as described by Weill et al. (40), except the annealing conditions were changed to 30 s at 60°C in our experiment. The donor, recipient, and transconjugants obtained in vitro were included as controls for the PCRs.

Twelve isolates were also tested for antibiotic susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, ceftiofur, cefuroxime, nalidixic acid, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline, trimethoprim, and trimethoprim-sulfamethoxazole by using a commercially prepared, dehydrated panel (Trek Diagnostic Systems, Ltd., East Grinstead, West Sussex, United Kingdom) according to the method and interpretative criteria proposed by CLSI or EUCAST (www.eucast.org) (10, 11). Since most ESBLs have MICs above the established clinical resistance breakpoints, the epidemiological cutoff values (threshold value which distinguishes microorganisms with or without an acquired resistance gene, according to EUCAST) were used to classify the susceptibility of isolates to cefotaxime, ceftazidime, ceftiofur, cefoxitin, and cefuroxime. The MIC of cefixime was determined with an Etest strip (AB Biodisk, Solna, Sweden) on Mueller Hinton agar (AES, Bruz, France). The donor, recipient, and in vitro transconjugants were also included. *E. coli* ATCC 25922 was used as a quality control.

Cefixime concentrations in fecal samples were determined by the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method. The antibiotic levels were determined in fecal samples, twice daily on days 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 27, 29, 31 and 34. Feces (200 mg) were homogenized in sterile water (10%) and centrifuged (6,000  $\times$  g, 5 min). Supernatant (1 ml) was taken and centrifuged at 20,000  $\times$  g for 10 min. The resulting supernatant phase was injected onto the LC-MS system for analysis. The chromatographic separation was achieved on a Zorbax ECLIPSE XDB-C<sub>8</sub> column (150 by 2.1 mm [inner diameter, 5  $\mu$ m]; Agilent, Wilmington, DE) with a 12.5-by-2.1-mm (inner diameter) Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub> (5  $\mu$ m) guard column (Agilent), using a mobile phase of 0.3% acetonitrile-formic acid (19:81 [vol/vol]). The liquid flow rate was set at 0.2 ml/min. The column temperature was maintained at 24°C. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode. Quantification was performed with selected reaction monitoring (SRM) of *m/z* 454 to *m/z* 348 for cefixime and cephalexin (internal standard), respectively, with a scan time of 0.3 s per transition showing the [M+H]<sup>+</sup> product ion spectra of cefixime and cephalexin. The spray voltage was set at voltage capillary 3 and the cone voltage at 30 kV. Nitrogen was used for "nebulization" at a rate of 500 liters/h. The heated capillary temperature was set to 280°C. The lower limit of quantification was 2 mg/kg. The intra-assay coefficients of variation (repeatability) were 10.69 and 1.36% for quality control samples of 2 and 50 mg/kg, respectively. The interassay coefficients of variation (intermediate precision) were 10.69 and 2.67% for the quality control samples of 2 and 50 mg/kg. The area under the curve (AUC<sub>14-22</sub>) was calculated by the linear trapezoidal method. The mean concentration of cefixime was estimated during treatment between days 14 and day 22 as AUC<sub>14-22</sub>/T, with T representing the period of time between days 14 and 22.

The statistical analysis was carried out with SYSTAT version 12.0 for Windows. In the in vivo experiments, the numbers of transconjugants, recipients, and donors, with or without antibiotic treatment, were compared by using a two-way analysis of variance with interaction. The experimental unit used was the rat. Repeat measures (*n* = 5) were taken on the rat for each treatment and time. The factors tested were time, treatment, and the time-treatment interaction. Differences were considered significant at *P* values of <0.05.

## RESULTS

**In vitro transfer.** The mean frequency in five independent experiments was  $(5.9 \pm 5.7) \times 10^{-8}$  (Table 1). All of the transconjugants obtained were resistant to cefixime at 8  $\mu$ g/ml.

**In vivo transfer.** Before cefixime administration, *E. coli* J5 was allowed to colonize the digestive tracts of all axenic rats, and the densities of recipient *E. coli* were  $\sim 10^9$  CFU per g of feces before donor *S. enterica* serovar Virchow administration (Fig. 1). In all animals, after inoculation with the donor strain, the densities of this bacterium reached  $\sim 10^8$  CFU/g of feces, whereas *E. coli* dropped 2 log units from day 0 to day 14. At the same time, *E. coli* J5(p3464b) transconjugants rapidly appeared to reach  $\sim 10^3$  CFU/g of feces. For the control treatment, donor, recipient, and transconjugant strains established

TABLE 1. Number of transconjugants per donor in vitro and in gnotobiotic rats treated with or without cefixime

Group <sup>a</sup>	No. of transconjugants $\pm$ SD per donor		
	In vitro	In vivo	
		Before treatment	After treatment
Control	$(5.9 \pm 5.7) \times 10^{-8}$	$(5.4 \pm 7.1) \times 10^{-5}$	$(6.3 \pm 1.2) \times 10^{-5}$
Treated		$(1.1 \pm 1.3) \times 10^{-4}$	$(1.2 \pm 5.6) \times 10^{-5}$

<sup>a</sup> Rats treated without cefixime (control) received drug-free water. Treated rats were given 4 mg/kg twice daily for 8 days.

stable population levels throughout the experiment with a mean transconjugant/donor ratio of  $\sim 10^{-5}$  (Table 1).

One day after cefixime administration, the number of transconjugants decreased statistically ( $P < 0.001$ ) to undetectable levels. Five days after cefixime treatment (day 27), counts of transconjugants were  $\sim 10^3$  CFU/g of feces. By day 35, this population had reached  $\sim 10^5$  CFU/g of feces. Conversely, the donor strains shown to be less affected by cefixime treatment than the transconjugant strains, displaying a decrease in frequency by a factor of about 200 over the first few days of treatment. The recipient population dropped drastically by a factor of about 4,000 within 24 h after cefixime administration ( $P < 0.001$ ) and remained at this level throughout the treatment (Fig. 1b). When cefixime was removed, this level was estimated at  $\sim 10^4$  CFU/g of feces, with a value of  $\sim 10^7$  CFU/g of feces at the end of the experiment. At the end of the experiment, the mean ratio of transconjugant per donor was  $(6.3 \pm 1.2) \times 10^{-5}$  and  $(1.2 \pm 5.6) \times 10^{-5}$  for the control and treated group, respectively (Table 1).

**Verification of transconjugants.** PCR analysis indicated the presence of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene in all transconjugants.

Table 2 compared the susceptibility of representative transconjugants obtained in vivo before, during, and after cefixime treatment to the susceptibility of donor, recipient, and transconjugants obtained in vitro. Regardless of the sampling treatment period, the transconjugants had acquired resistance to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, cefixime, cefotaxime, ceftazidime, ceftiofur, and cefuroxime absent from the parental *E. coli* J5 strain. Their susceptibility to cefotaxime, ceftazidime, and ceftiofur had decreased to levels similar to those in *S. enterica* serovar Virchow based on the MIC of these cephalosporin antibiotics and resistance phenotype profiles. Transconjugants were considered to be ESBL-positive strains at the epidemiological EUCAST cutoff value.

Other resistance determinants, including streptomycin, tetracycline, trimethoprim, sulfamethoxazole and trimethoprim-sulfamethoxazole were cotransferred with cephalosporin resistance to in vitro transconjugants but not to transconjugants obtained in vivo. Furthermore, after cefixime treatment, these isolates showed decreased susceptibilities to sulfamethoxazole with MICs of 8 to 32  $\mu$ g/ml, but not resistance. Nalidixic acid resistance was not transferred to transconjugants obtained in vitro or in vivo.

**Quantification of cefixime in rat feces.** The cefixime concentrations in the fecal samples from treated rats were estimated by LC-MS, twice daily for 20 days (Fig. 2). Mean cefixime levels were 37.2 mg/kg of feces during cefixime treatment and

decreased to reach the limit of quantification of 2 mg/kg in 8 days.

## DISCUSSION

This study was prompted by the demonstration that *S. enterica* serovar Virchow isolated from chickens could transfer the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> resistance gene to *E. coli* in a conjugation experiment (40). In this prior report by Weill et al., in vitro mating was carried out on liquid media to show the ability of plasmid transfer without indicating the transfer frequency. We have redesigned the experiment in vitro to achieve a transfer rate comparable to that obtained in vivo. Efficient transfer of this gene from the donor to plasmid-free recipients was measured at a frequency of about  $(5.9 \pm 5.7) \times 10^{-8}$  transconjugants per donor. This transfer rate is lower than those reported in previously published in vitro mating studies (23, 24). However, it has also been reported that, in vitro, interspecies transfer is less efficient than intraspecies transfer (19, 20, 29).

We investigated whether conjugative transfer of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene could also occur in vivo, by carrying out transfer experiments in gnotobiotic rats. This model has already been used to study conjugal transfer, because the use of axenic animals inoculated with only the donor and recipient strains overcomes the problem associated with bacterial competition and promotes intestinal colonization by the strains involved in gene exchange (15). In vivo, *E. coli* transconjugants appeared rapidly in all animals after inoculation with the recipient and donor strains, reaching levels of  $\sim 10^5$  CFU/g. These levels remained stable for the 27 days of the experiment in the con-

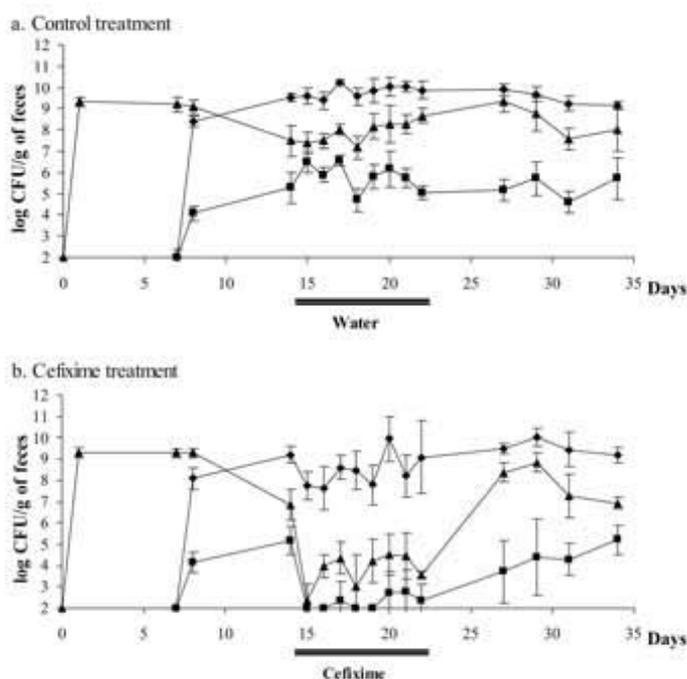


FIG. 1. Bacterial counts in homogenized feces from gnotobiotic rats treated with sterile water ( $n = 5$ ) (control treatment [a]) or with cefixime ( $n = 5$ ) (cefixime treatment [b]). Symbols:  $\blacklozenge$ , donor *S. enterica* Virchow 3464b;  $\blacktriangle$ , recipient *E. coli* J5 and *E. coli* J5(p3464b) transconjugants;  $\blacksquare$ , *E. coli* J5(p3464b) transconjugants. The bar under the x axis represents the time of treatment. Values are the means of results, and error bars represent the standard deviation.

TABLE 2. Susceptibility or resistance of the isolated strains in the present study

Antibiotic	Note <sup>a</sup>	Susceptibility (S) or resistance (R) (MIC [ $\mu$ g/ml])						
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	Donor <i>S. enterica</i> serovar Virchow 3464b	Recipient <i>E. coli</i> J5	<i>E. coli</i> J5(p3464b) transconjugant in vitro <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> J5(p3464b) transconjugant <sup>b</sup>		
						Before treatment	7 days posttreatment	12 days posttreatment
Amoxicillin-clavulanic acid	A, D	S (4)	R (8)	S (4)	R (8)	R (32)	R (32)	R (32)
Ampicillin	A, D, E	S (4)	R (128)	S (4)	R (128)	R (64)	R (32)	R (32)
Cefixime	B, D, E	S (0.13)	R (8)	S (0.13)	R (8)	R (8)	R (8)	R (8)
Cefotaxime	A, C, E	S (0.03)	R (>8)	S (0.03)	R (8)	R (0.50)	R (0.50)	R (1)
Cefoxitin	A, C	S (4)	S (16)	S (4)	S (4)	R (32)	S (16)	S (16)
Ceftazidime	A, C, E	S (0.13)	R (8)	S (0.13)	R (2)	R (4)	R (2)	R (2)
Ceftiofur	A, C, E	S (0.25)	R (>8)	S (0.25)	R (8)	R (1)	R (1)	R (1)
Cefuroxime	A, C, E	S (2)	R (>32)	S (2)	R (32)	R (32)	R (32)	R (32)
Nalidixic acid	A, D	S (4)	R (256)	S (4)	S (4)	S (4)	S (8)	S (8)
Streptomycin	A, C	S (2)	R (128)	S (2)	R (16)	S (2)	S (2)	S (2)
Sulfamethoxazole	A, D	S (8)	R (>512)	S (8)	R (>512)	S (8)	S (32)	S (32)
Tetracycline	A, D	S (1)	R (64)	S (1)	R (16)	S (1)	S (2)	S (2)
Trimethoprim	A, D	S (0.50)	R (>64)	S (0.50)	R (16)	S (0.50)	S (1)	S (1)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	A, D	S (<1)	R (>16)	S (<1)	R (16)	S (1)	S (1)	S (1)

<sup>a</sup> A, the MICs of antimicrobial agents were determined by the broth microdilution method; B, the MICs of cefixime were determined with Etest strips; C, results were interpretative of susceptible or resistant strains according to the criteria proposed by EUCAST; D, results were interpretative of susceptible or resistant strains according to the criteria proposed by CLSI; E, resistance to this antibiotic was presumably mediated by CTX-M-9 enzyme.

<sup>b</sup> The MICs of one of the four isolated transconjugants are presented in the table (all transconjugants have the same susceptibility values).

trol group. Our results are consistent with other demonstrations of the conjugal transfer of resistance genes in gnotobiotic animals in the absence of selective pressure (12, 18). In vivo, the ratio of transconjugants per donor was 4 log units higher than in mating experiments on an agar plate. Similar findings were recently reported by Feld et al., who obtained a rate of plasmid transfer from *L. plantarum* to *E. faecalis* 3 to 4 log units higher in the gnotobiotic model than in vitro (15). This may be due to the constant mixing of bacteria by the peristaltic movements of the gastrointestinal tract, providing donor bacteria with greater access to recipient bacteria than during filter mating, in which the bacteria move much less (26). Antibiotics have been shown to stimulate the spread of conjugative antibiotic resistance plasmids by increasing transfer rates (35). However, in our study, cefixime treatment at a dose of 4 mg/kg/day twice daily for 8 days was bactericidal rather than exerting selective pressure for both cefixime-susceptible recipients and cefixime-resistant transconjugants and donors. This finding is consistent with the results of a study demonstrating no increase in the rates of transfer of the conjugative plasmid containing *cmv-2* to *S. enterica* Newport and *E. coli* in animals treated with a single dose of ceftiofur (38). Moreover, the

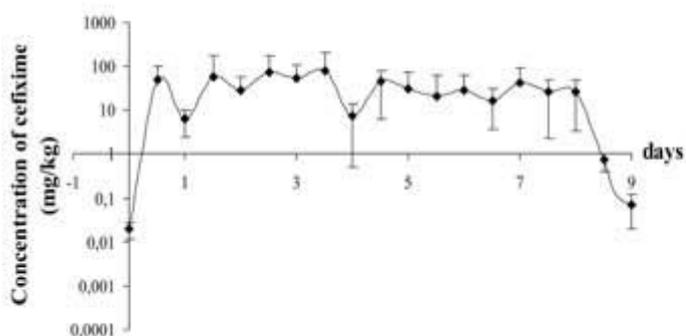


FIG. 2. Mean cefixime concentrations in fecal samples from treated rats ( $n = 5$ ). The errors bars represent the standard deviation.

apparent antibiotic concentrations measured in feces were 4 to 250 times higher than cefixime MICs for *S. enterica* serovar Virchow (MIC < 8  $\mu$ g/ml), transconjugant *E. coli* J5 p3464b (MIC < 8  $\mu$ g/ml), and *E. coli* J5 (MIC < 0.125  $\mu$ g/ml). Binding to the fecal material has not been determined. However, considering that (i) cefixime is not metabolized by the rat's intrinsic metabolism and (ii) minimal binding in feces is equal to the plasma binding protein, i.e., 63% for an average fecal concentration of 37  $\mu$ g/g, the actual active concentration of cefixime was 13.7  $\mu$ g/g, which is much higher than the MIC of susceptible or resistant strains. In cases where binding is 99%, this active concentration will decrease to 0.37  $\mu$ g/g of feces, which is still twice the MIC of susceptible *E. coli* strains. The decrease in population size observed for all strains was more pronounced for transconjugants (~3.5 log units) than donors (~1.5 log units). After the first administration of cefixime, the levels of donor and recipient strains decreased, whereas transconjugants were more strongly affected by the drug. A possible explanation for this could be that the regrowth of recipient strains after 1 day of cefixime administration was not sufficient to allow plasmid transfer. Donor and recipient strain concentrations must be equivalent or close to provide effective conjugation, and that was not the case in the treated rats (1). Alternatively, donor and transconjugant population levels may affect the MIC of cefixime in the digestive tract. Inoculum size is known to affect the MIC of extended-spectrum cephalosporins, with 40 to 200 times higher MICs reported for the highest levels of inoculum under laboratory conditions (6, 37). This may result in lower rates of multiplication of the transconjugants than of the susceptible parental strain (22). Indeed, the generation time of the *E. coli* recipient strain was 24 min, whereas that of the transconjugants was 38 min (data not shown). These findings are also consistent with the slower increase in the numbers of resistant *E. coli* after the removal of cefixime.

Nalidixic acid resistance was not transferred in vitro and in

vivo to *E. coli* recipient strains. This result may be attributed to the chromosomal resistance by mutations in the chromosome (40). Resistance to streptomycin, tetracycline, trimethoprim, and trimethoprim-sulfamethoxazole, which were located on single plasmids in the donor strain, were observed in CTX-M-9-producing transconjugants obtained *in vitro* but not expressed in CTX-M-9-producing transconjugants isolated during the experimental period. Similar results were obtained by Novais et al. (34) for a percentage of transconjugants, even though In60 contains the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene and gene cassettes presumably responsible for these resistance phenotypes. Hypotheses, such as gene inactivation or silencing, have been put forward, but no conformational experiments have been conducted.

Although antibiotic selective pressure has been shown to increase the proportion of antibiotic resistance genes *in vivo*, most experiments have been conducted with subinhibitory antibiotic concentrations (13, 27, 32, 33). In our study, we investigated modulation of the transfer during a therapeutic antibiotic treatment. We found that experiments assessing transfer *in vitro* underestimated potential transfer in the digestive tract. We also showed that transfer of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> resistance gene plasmid occurred *in vivo* but was not enhanced by cefixime administered at concentrations equivalent to those used in therapeutic treatment. Given the potential risk to humans of the presence of resistant strains in the digestive tract, the antimicrobial treatment effect on resistance gene dissemination should be studied in more detail in a rat model with complex human intestinal flora.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the animal keepers, S. Marteau and J. G. Rolland, and technical agents P. Louapre and C. Poirier at AFSSA-Fougères for their help.

#### REFERENCES

- Bailey, J. E., N. A. Da Silva, S. W. Peretti, J. H. Seo, and F. Srienc. 1986. Studies of host-plasmid interactions in recombinant microorganisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **469**:194–211.
- Bej, A. K., J. L. DiCesare, L. Haff, and R. M. Atlas. 1991. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1013–1017.
- Bej, A. K., S. C. McCarty, and R. M. Atlas. 1991. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2429–2432.
- Ben-Ami, R., M. J. Schwaber, S. Navon-Venezia, D. Schwartz, M. Giladi, I. Chmelnitsky, A. Leavitt, and Y. Carmeli. 2006. Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin. Infect. Dis.* **42**:925–934.
- Bertrand, S., F. X. Weill, A. Cloeckaert, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemaue, C. Godard, P. Butaye, H. Imberechts, P. A. Grimont, and J. M. Collard. 2006. Clonal emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J. Clin. Microbiol.* **44**:2897–2903.
- Betriu, C., S. Salso, A. Sánchez, E. Culebras, M. Gómez, I. Rodríguez-Avial, and J. J. Picazo. 2006. Comparative *in vitro* activity and the inoculum effect of ertapenem against *Enterobacteriaceae* resistant to extended-spectrum cephalosporins. *Int. J. Antimicrob. Agents* **28**:1–5.
- Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1–14.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:933–951.
- Canton, R., and T. M. Coque. 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:466–475.
- CLSI. 2007. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents; approved guideline, 3rd ed. M37-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dahl, K. H., D. D. Mater, M. J. Flores, P. J. Johnsen, T. Midtvedt, G. Corthier, and A. Sundsfjord. 2007. Transfer of plasmid and chromosomal glycopeptide resistance determinants occurs more readily in the digestive tract of mice than *in vitro* and exconjugants can persist stably *in vivo* in the absence of glycopeptide selection. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:478–486.
- Doucet-Populaire, F., P. Trieu-Cuot, I. Doshbaa, A. Andreumont, and P. Courvalin. 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:185–187.
- Eckert, C., V. Gautier, M. Saladin-Allard, N. Hidri, C. Verdet, Z. Ould-Hocine, G. Barnaud, F. Delisle, A. Rossier, T. Lambert, A. Philippon, and G. Arlet. 2004. Dissemination of CTX-M-type  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1249–1255.
- Feld, L., S. Schjorring, K. Hammer, T. R. Licht, M. Danielsen, K. Krogh, and A. Wilcks. 2008. Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment. *J. Antimicrob. Chemother.* **1**:65–70.
- Fernandez, A. G., A. Cloeckaert, A. Bertini, K. Praud, B. Doublet, F. X. Weill, and A. Carattoli. 2007. Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> or *bla*<sub>CTX-M-9</sub> from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4177–4180.
- Hasman, H., D. Mevius, K. Veldman, I. Olesen, and F. M. Aarestrup. 2005.  $\beta$ -Lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products, and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:115–121.
- Jacobsen, L., A. Wilcks, K. Hammer, G. Huys, D. Gevers, and S. R. Andersen. 2007. Horizontal transfer of *ter*(M) and *erm*(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**:158–166.
- Launay, A., S. A. Ballard, P. D. Johnson, M. L. Grayson, and T. Lambert. 2006. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1054–1062.
- Leclercq, R., E. Derlot, M. Weber, J. Duval, and P. Courvalin. 1989. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:10–15.
- Lee, K., D. Yong, Y. S. Choi, J. H. Yum, J. M. Kim, N. Woodford, D. M. Livermore, and Y. Chong. 2007. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1  $\beta$ -lactamases co-mediated by porin loss. *Int. J. Antimicrob. Agents* **29**:201–206.
- Lenski, R. E. 1998. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Int. Microbiol.* **1**:265–270.
- Lester, C. H., N. Frimodt-Moller, and A. M. Hammerum. 2004. Conjugal transfer of aminoglycoside and macrolide resistance between *Enterococcus faecium* isolates in the intestine of streptomycin-treated mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**:385–391.
- Lester, C. H., N. Frimodt-Moller, T. L. Sorensen, D. L. Monnet, and A. M. Hammerum. 2006. *In vivo* transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:596–599.
- Lewis, J. S., 2nd, M. Herrera, B. Wickes, J. E. Patterson, and J. H. Jorgensen. 2007. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4015–4021.
- Licht, T. R., B. B. Christensen, K. A. Krogh, and S. Molin. 1999. Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology* **145**:2615–2622.
- Licht, T. R., C. Struve, B. B. Christensen, R. L. Poulsen, S. Molin, and K. A. Krogh. 2003. Evidence of increased spread and establishment of plasmid RP4 in the intestine under sub-inhibitory tetracycline concentrations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**:217–223.
- Luzzaro, F., M. Mezzatesta, C. Mugnaioli, M. Perilli, S. Stefani, G. Amicosante, G. M. Rossolini, and A. Toniolo. 2006. Trends in production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1659–1664.
- Manson, J. M., S. Keis, J. M. Smith, and G. M. Cook. 2003. Characterization of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VREF) isolate from a dog with mastitis: further evidence of a clonal lineage of VREF in New Zealand. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3331–3333.
- Mendonça, N., J. Leitao, V. Manageiro, E. Ferreira, and M. Canica. 2007. Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-producing *Escherichia*

- coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1946–1955.
31. Meunier, D., E. Jouy, C. Lazizzera, M. Kobisch, and J.-Y. Madec. 2006. CTX-M-1- and CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *J. Antimicrob. Agents* **28**:402–407.
  32. Morelli, L., P. G. Sarra, and V. Bottazzi. 1988. *In vivo* transfer of pAM  $\beta$ 1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.* **65**:371–375.
  33. Moubareck, C., N. Bourgeois, P. Courvalin, and F. Doucet-Populaire. 2003. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2993–2996.
  34. Novais, A., R. Canton, A. Valverde, E. Machado, J. C. Galan, L. Peixe, A. Carattoli, F. Baquero, and T. M. Coque. 2006. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class I integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncH12, IncP1- $\alpha$ , and IncF1 groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2741–2750.
  35. Ohlsen, K., T. Ternes, G. Werner, U. Wallner, D. Löffler, W. Ziebuhr, W. Witte, and J. Hacker. 2003. Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. *Environ. Microbiol.* **5**:711–716.
  36. Pallecchi, L., A. Bartoloni, C. Fiorelli, A. Mantella, T. Di Maggio, H. Gamboa, E. Gotuzzo, G. Kronvall, F. Paradisi, and G. M. Rossolini. 2007. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2720–2725.
  37. Phillipon, A., V. Jarlier, P. Legrand, G. Fournier, M. H. Nicolas, and J. Duval. 1989. Antibacterial activity of cefixime in presence of  $\beta$ -lactamases produced by *Enterobacteriaceae*. *Presse Med.* **18**:1560–1566.
  38. Poppe, C., L. C. Martin, C. L. Gyles, R. Reid-Smith, P. Boerlin, S. A. McEwen, J. F. Prescott, and K. R. Forward. 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1184–1192.
  39. Su, L. H., C. Chu, A. Cloeckert, and C. H. Chiu. 2008. An epidemic of plasmids? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**:155–168.
  40. Weill, F. X., R. Lailier, K. Praud, A. Kerouanton, L. Fabre, A. Brisabois, P. A. Grimont, and A. Cloeckert. 2004. Emergence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5767–5773.
  41. Zaidi, M. B., V. Leon, C. Canche, C. Perez, S. Zhao, S. K. Hubert, J. Abbott, K. Blickenstaff, and P. F. McDermott. 2007. Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla*<sub>CTX-M-2</sub> *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:398–401.

## **ARTICLE 2**

**Transfert du gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> de *Salmonella enterica* Virchow aux entérobactéries chez des rats associés à une flore humaine : impact d'un traitement au céfixime**

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy (accepté)*

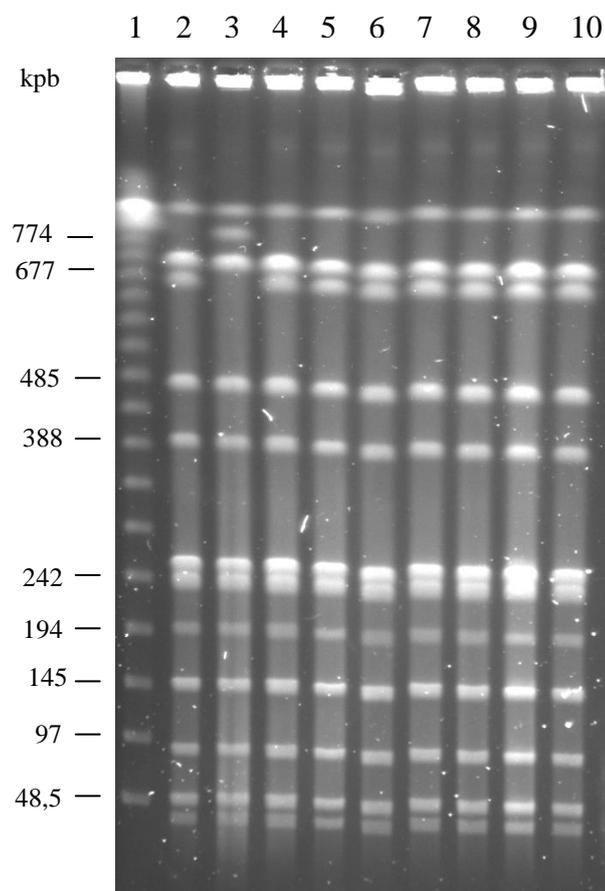
## OBJECTIFS

L'objectif de cette étude était de montrer l'impact d'un traitement au céfixime sur le transfert du gène de résistance *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, de *Salmonella enterica* Virchow à *Escherichia coli* chez des rats associés à une flore humaine (rat-AFH).

## MATERIELS ET METHODES

Cinq groupes de rats-AFH (A, B, C, D, et E) sont constitués pour évaluer le transfert du gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> dans la flore avec ou sans pression de sélection. Dans chacun des groupes, cinq rats axéniques reçoivent 1 ml de la suspension fécale obtenue à partir de deux volontaires sains. Après la vérification de l'implantation de la flore humaine ainsi que l'absence de salmonelles et d'entérobactéries résistantes au céfixime, *S. enterica* Virchow est inoculée à tous les rats-AFH. Concernant, les groupes C, D et E, une souche réceptrice, *E. coli* J5, est administrée 2 h avant la souche donneuse. Le jour suivant, les rats-AFH sont traités par voie orale avec : groupe A, de l'eau stérile ; groupe B, du céfixime; groupe C, de l'eau stérile ; groupe D, du céfixime et groupe E, du céfixime combiné à de l'acide clavulanique (12.5%). Le céfixime est administré à 4 mg/kg, deux fois par jour pendant 8 jours. Comme dans l'étude précédente, l'apparition de transconjugants *E. coli* dans les fécès de chaque rat-AFH est mesurée par dénombrement sur milieux sélectifs, pendant et après le traitement. Pour chaque rat, cinq colonies ont été prélevées de ces milieux et confirmées comme étant des transconjugants *E. coli* par amplification du gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> et du gène *uidA*. La relation clonale des transconjugants avec *E. coli* J5 est étudiée à l'aide d'une électrophorèse en champs pulsé après digestion de l'ADN par l'enzyme *Bln* I. La sensibilité des souches vis-à-vis de différents antibiotiques (céfixime, amoxicilline/ acide clavulanique, céfotaxime, céfoxitine, ceftazidime, ceftiofur, céfuroxime, acide nalidixique, streptomycine, sulfaméthoxazole, tétracycline, triméthoprimé et triméthoprimé/sulfaméthoxazole) est mesurée par E-test ou à l'aide de microplaques d'antibiotiques déshydratés. Les concentrations fécales de céfixime sont déterminées chez tous les rats traités au céfixime par CL-MS.

Figure 23. Electrophorèse en champ pulsé de 10 transconjugants-*Escherichia coli*. Ligne 1, marqueur lambda; ligne 2-9, transconjugants-*E. coli*; ligne 10, *E. coli* J5.



## RESULTATS

Chez tous les rats-AFH, la flore fécale humaine s'est implantée. La composition bactérienne est très proche de celle retrouvée dans l'inoculum de fécès humain.

**En absence de céfixime** (groupes A et C), les entérobactéries endogènes résistantes au céfixime n'ont pas été détectées. Néanmoins, en présence de *E. coli* J5, les transconjugants *E. coli* J5 apparaissent rapidement mais ne persistent pas plus de deux jours. La fréquence de transfert est de  $\sim 10^{-1}$  transconjugants / donneurs. A la fin de l'expérience, *S. enterica* Virchow est détecté chez un rat-AFH sur cinq.

**En présence de céfixime** (groupe B et D), aucune entérobactérie endogène résistante au céfixime n'a été observée quelque soit le groupe considéré. Comme précédemment, en présence de la souche *E. coli* J5, les transconjugants *E. coli* J5 sont rapidement détectés mais disparaissent au bout de deux jours (groupe D). La fréquence de transfert est de  $\sim 10^{-1}$  transconjugants / donneurs. Onze jours après l'arrêt du traitement, *S. enterica* Virchow est dénombrées dans les fécès de trois rats-AFH sur cinq. Curieusement, les populations de transconjugants *E. coli* J5 restent indétectables.

**En présence de céfixime combiné avec l'acide clavulanique** (groupe E), les résultats sont identiques à ceux trouvés en présence du céfixime seul. La différence majeure concerne la disparition totale de *S. enterica* Virchow à la fin de l'expérimentation chez tous les rats-AFH.

**Détection du céfixime dans les fécès.** Pendant les 8 jours de traitement, aucune trace de céfixime n'a été détectée dans les fécès des rats-AFH (groupe B, D et E). Le traitement des rats-AFH avec de l'acide clavulanique combiné avec le céfixime n'a pas suffi à détecter l'antibiotique dans les fécès des animaux.

**Analyse des transconjugants.** Quinze transconjugants *E. coli* ont été isolées au cours de la phase initiale du transfert de gène parmi les groupes C, D et E. L'analyse des pulsotypes montrent que les transconjugants sont tous issus de la souche réceptrice *E. coli* J5. D'après le gel d'électrophorèse représenté sur la figure 23, un pulsotype (ligne 3) se distingue des dix autres par la présence d'un fragment de  $\sim 774$  kb au lieu de  $\sim 677$  kb pour les autres pulsotypes (résultat non publié). De plus, comme dans l'étude présentée dans l'article 1, le co-transfert des gènes codant pour la résistance à la streptomycine, le sulphaméthoxazole, la tétracycline et la triméthoprimine n'a pas été observé.

## CONCLUSION

Ces résultats suggèrent que le transfert de gène de résistance entre une souche d'origine animale et une souche commensale est possible. Néanmoins, la présence de souches réceptrices dans la flore est indispensable. En effet, aucun transconjugant issu des entérobactéries de la flore humaine n'a été mis en évidence dans les fécès de rat-AFH, même avec une pression de sélection. Le traitement au céfixime entraîne cependant la sélection et la persistance de *S. enterica* Virchow. Le transfert de gène de résistance dans la flore semblerait être un événement rare. Néanmoins, l'utilisation d'antibiotique semble favoriser la persistance et l'implantation de bactéries résistantes comme les salmonelles. Ainsi, la présence de telles souches dans la flore humaine pourrait compromettre le succès thérapeutique du patient mais également constituerait un important réservoir de gène de résistance.

**Transfer of plasmid-mediated CTX-M-9 from *Salmonella enterica* Virchow to *Enterobacteriaceae* in human flora-associated rat (HFA-rat) treated with cefixime**

Faure, S<sup>1</sup>; Perrin-Guyomard, A<sup>1\*</sup>; Delmas, JM<sup>1</sup>; Chatre, P<sup>2</sup>; Laurentie, M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for the Research and Investigation of Veterinary Drugs and Disinfectants, Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Unit, AFSSA Fougères, BP 90203, La Haute Marche, 35133 Javené, France.

<sup>2</sup>Bacteriology Unit, AFSSA Lyon, 31, Ave. Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 7, France.

\*Corresponding author. Tel.: 33(2)-99-94-78-78; fax: 33(2)-99-94-78-99

E-mail address: [a.perrin-guyomard@afssa.fr](mailto:a.perrin-guyomard@afssa.fr)

## ABSTRACT

Food animals are a potential source of CTX-M resistance genes for human pathogens. We evaluated the transfer of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene from animal strain of *Salmonella enterica* Virchow to *Enterobacteriaceae* of the human intestinal flora, using human flora-associated rats (HFA-rat) with and without cefixime treatment. In the absence of antibiotic, no transconjugant enterobacteria were found in the feces of HFA-rats. However, the transfer rate was high if *Escherichia coli* J5 recipient strains were co-inoculated orally with *Salmonella*. *S. enterica* Virchow persisted in the rat fecal flora, both during and after treatment with therapeutic doses of cefixime. The drug did not increase the transfer rate and *E. coli* J5-transconjugants were eliminated from the flora before the end of cefixime treatment. No cefixime was recovered in the rat feces. In the presence of recipient strains, the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> resistance gene was transferred from a strain of animal origin to the human intestinal flora, although transconjugant colonization was transient. Antibiotic use enhanced the persistence of donor strains, increasing the resistance gene pool and the risk of its spread.

Keywords: horizontal gene transfer, antibiotic resistance, CTX-M, *Salmonella*, human flora.

## INTRODUCTION

CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) are enzymes responsible for catalyzing the hydrolysis of monobactam and extended-spectrum cephalosporin. Over the last 10 years, these  $\beta$ -lactamases have been identified around the world, and they now have the highest prevalence of any type of ESBL (9, 10, 14, 15, 30, 36). This dramatic increase in their frequency may be attributed to the rapid dissemination of resistant bacterial clones and to their genetic structure, with the resistance genes carried on plasmids and transposons (14, 47). The spread of these resistance genes in human strains would represent a major ecological and public health problem, because bacteria carrying these enzymes are not limited to hospitals. They are also frequent among commensal bacteria in the community. The consumption of contaminated food is thought to be the principal mode of spread of resistant strains to the general population (33, 43). Several epidemiological analyses have investigated possible clonal relationships between resistant animal and human strains (4, 24, 49). Mesa *et al.* (32) showed that ESBL-producing enterobacteria were widespread in different environments in Spain, but established no clear link between food and the spread of ESBL resistance to human strains. Lavilla *et al.* (26) obtained circumstantial evidence to suggest that food could serve as a vector for the transmission of ESBL-producers between subjects, food handlers and food animals during outbreaks, but their conclusions were indirect. Experimental studies have generated conflicting findings concerning the transfer of resistance genes in the human intestinal tract. Bonner *et al.* (6) suggested that bacteria from livestock could not persist in humans and, therefore, did not constitute a threat. Prescott *et al.* (42) agreed that conditions in the human gut did not favor the transfer of resistance genes, but pointed out that continuous exposure to an antibiotic would lead to the selection of organisms best able to colonize the gut (i.e. resistant strains). However, plasmid-mediated antibiotic resistance transfer may occur in the ileum (5), and Schjorring *et al.* (45) recently highlighted the effect of antimicrobial treatment on horizontal gene transfer from an exogenous bacteria to a susceptible strain present in the mouse intestinal flora.

From 2002 to 2003, a dual emergence in France of CTX-M-9-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow was reported from poultry sources and to a lesser extent from human (49). *Salmonella* spp. is mostly described as food borne pathogen leading to important therapeutic difficulties, especially in children, for whom extended-spectrum cephalosporins are the treatment of choice (22). Moreover, dissemination in humans

of CTX-M-9 and CTX-M-14 from food has already been highlighted in 2001 in Spain (7, 41). Since in 2003 in France, the CTX-M-9-producing human isolates were still rare, we investigated the probability of spread of this plasmid-borne *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene from one strain of *Salmonella enterica* Virchow isolated from poultry to enterobacteria of the normal human intestinal flora in a human flora-associated rat model (HFA-rat). We also assessed the effect of cefixime on the rate of resistance transfer and the persistence of resistant strains.

## MATERIALS AND METHODS

Donor and recipient strains. We studied transfer of the plasmid-borne *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene from a donor strain isolated from chickens, *Salmonella enterica* serovar Virchow (strain 3464b) (49). This strain was resistant to amoxicillin/clavulanic acid, cefixime, cefotaxime, ceftazidime, ceftiofur, cefuroxime, nalidixic acid, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline, trimethoprim and trimethoprim/sulfamethoxazole, but was susceptible to rifampicin. *Escherichia coli* J5 was used as the recipient strain. This strain is resistant to rifampicin and susceptible to cefixime.

Human fecal flora. We collected human fecal flora from two donors selected from seven healthy volunteers living in Brittany, France. None had received pharmacological treatment for at least three months before the study and all ate traditional European meals. We checked for an absence of cefixime- and rifampicin-resistant enterobacteria and *Salmonella* spp. in each donor.

Media. Fresh human stool or HFA-rat samples were mixed with tryptone glucose yeast extract (AES, Bruz, France) (1% w: v) under anaerobic conditions. Appropriate ten-fold serial dilutions of the supernatant were plated on selective agar media for colony counts. The compositions of the fecal aerobic and anaerobic flora were determined as described by Perrin-Guyomard *et al.* (39). The total number of enterobacteria in the fecal flora of humans and rats was determined on Drigalski agar (Fischer-Bioblock Scientific, Illkirch, France) and compared with the counts obtained on Drigalski agar supplemented with 4 µg/ml cefixime (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), to estimate the percentage of bacteria resistant to the antibiotic. The donor *S. enterica* Virchow and the recipient *E. coli* J5 strains were cultured aerobically in brain heart infusion (AES, Bruz, France). *S. enterica* Virchow was counted on Brilliant green agar (Difco, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) supplemented with 4 µg/ml cefixime. *E. coli* J5 was counted on Drigalski agar supplemented with 250 µg/ml rifampicin, with the addition of 4 µg/ml cefixime for *E. coli* J5-transconjugants. All *Enterobacteriaceae*, donor and recipient strains were incubated at 37°C for 24 h to 48 h under aerobic conditions. The detection limit for bacterial counts was 2 log<sub>10</sub> CFU/g of feces. The transfer rate was defined as the number of transconjugants divided by the number of donor colonies.

Test substances. Cefixime (Oroken® 100 mg, Sanofi-Aventis, France) was administered by gavage at a dose of 4 mg/kg twice daily for 8 days. The antibiotic was reconstituted and stored according to the manufacturer's instructions, by adding sterile water

to obtain a 20 g/l stock solution and stored at room temperature below 25 °C for one week. The cefixime/ clavulanic acid mixture (Promochem, Molsheim, France) was administered by gavage at a dose of 4 mg/kg twice daily for 8 days. The ratio of cefixime/clavulanic acid (w: w 12.5%) used was consistent with that commonly used in human treatment with a combination of  $\beta$ -lactam and clavulanic acid (48).

**Animals.** All procedures for animal experiments were performed under license, with approval from the institutional review board, in accordance with French national legislation. Germ-free female and male consanguineous C3H rats (mean age 3 weeks) from Charles River Laboratories, Arbresle, France, were transferred into a sterile Trexler-type plastic film isolator (Esi Flufrance, Massy, France) on arrival at our facilities. Each group of rats was kept in different isolator and rats were housed individually in a cage, isolated from the litter by a floor grid. The germ-free status of animals was checked immediately after their reception and during the acclimatization period, by testing fecal samples for the growth of aerobic and anaerobic bacteria and yeasts. Rats were provided with *ad libitum* access to a commercial diet sterilized by  $\gamma$  irradiation and were supplied with sterile water.

**Experimental design.** HFA-rats were assigned to five groups, each containing three females and two males. These groups were named A, B, C, D and E. After nine days of acclimatization, all germ-free rats were inoculated intragastrically with a strain of *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 ( $14 \log_{10}$  CFU/ animal) to reduce oxygen and substrate concentrations in the gut. Two days later, all rats were inoculated intragastrically with 1 ml of a suspension of mixed human feces. After sixteen days, all rats were inoculated intragastrically with  $8 \log_{10}$  CFU of *S. enterica* Virchow (day-1).

In addition, in groups C, D and E,  $8 \log_{10}$  CFU of the recipient *E. coli* J5 strain was inoculated intragastrically into the rats 2 h before the donor strain *S. enterica* Virchow. The next day (day 0), each group received antibiotic or water by gavage, as follows: group A, sterile water; group B, cefixime; group C, sterile water; group D, cefixime and group E, cefixime/clavulanic acid (Table 1). Feces were collected from individual rats one time before cefixime administration (day 0), five times per week during treatment and six times after the end of treatment, by provoked defecation. Each experiment lasted two months.

**Verification of transconjugants.** On day 0, five isolates growing on Drigalski agar containing cefixime and rifampicin was arbitrarily isolated from each rat sample for groups C, D and E. Only five bacterial colonies representing the group were identified as *E. coli* by PCR amplification of the *uidA* gene, as described by Bej *et al.* (2, 3). DNA was prepared from samples by adding the InstaGene Matrix kit (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) to the

bacterial suspension, according to the manufacturer's instructions. The transconjugants were then characterized by PFGE. PFGE analysis was performed with *BlnI* (Amersham Biosciences, Orsay, France) digestion, in a CHEF-DRIII system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, CA). The running conditions were 6 V/cm at 14 °C for 24 h, with pulse times ramped from 10 s to 60 s.

PCR detection of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene. A gene conferring resistance to cefixime (*bla*<sub>CTX-M-9</sub>) was detected by PCR in all transconjugants. Plasmid DNA was isolated with the QIAprep Spin Midiprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany). PCR assays, using primers targeting the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene, were carried out as described by Weill *et al.* (49), except that annealing was carried out for 30 s at 60°C in each cycle. The donor and recipient strains were included as positive and negative controls.

Antimicrobial drug susceptibility testing. The donor and recipient strains and 15 transconjugants were tested for susceptibility to the antimicrobial agents amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, ceftiofur, cefuroxime, nalidixic acid, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline, trimethoprim and trimethoprim/sulfamethoxazole, using a commercially prepared, dry panel (Trek Diagnostic, Systems Ltd in East Grinstead, West Sussex, United Kingdom). Etest strips on Müller-Hinton agar (AB Biodisk, Solna, Sweden) were used to determine the MIC of cefixime. The *E. coli* ATCC 25922 strain was used for quality control. Isolates were defined as sensible or resistant in accordance with clinical breakpoint proposed by CLSI or epidemiological cut-off values presented by EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)) for cefotaxime, ceftazidime, ceftiofur, cefoxitin and cefuroxime.

Determination of cefixime levels in fecal samples by the LC-MS method. Cefixime concentrations in fecal samples were quantified by the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method, as previously described (31). A validation study was performed, in which quality control (QC) rat feces sample containing known amounts of cefixime were compared with standard curves. The inter-assay coefficients of variation were 10.69 % and 2.67 % for QC samples containing 2 and 50 mg/kg, respectively, of the drug. The intra-assay coefficients of variation were 10.69 % and 1.36 % for QC samples containing 2 and 50 mg/kg, respectively. The lower limit of quantification was 2.18 mg/kg.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with Systat 12 software (Systat Software Inc., CA). The experimental unit was the rat. The effects of treatment with cefixime and cefixime-clavulanic acid treatment were assessed by an analysis of variance with interaction. The transfer rate was calculated by dividing the number of transconjugants by the

number of donor colonies for each rat. The geometric mean was calculated to represent the ratio of transconjugants to donors.

## RESULTS

Implantation of the human fecal flora in a rat model. HFA-rats were used to study conjugal transfer in the human gastrointestinal environment, with a complex microbiota providing the colonization barrier. Most human anaerobic and aerobic bacteria were transferred and persisted in the intestine of HFA-rats after inoculation. The mean composition of the rat fecal flora was similar to that of the human fecal flora, with up to about  $15 \log_{10}$  CFU per g of feces for the total anaerobic flora,  $14 \log_{10}$  CFU/g for the *Bacteroides fragilis* group,  $10 \log_{10}$  CFU/g for lactobacilli,  $11 \log_{10}$  CFU/g for bifidobacteria,  $10 \log_{10}$  CFU/g for clostridia,  $11 \log_{10}$  CFU/g for the total aerobic flora,  $10 \log_{10}$  CFU/g for enterococci and  $7 \log_{10}$  CFU/g for *Enterobacteriaceae*. Before the transfer experiment, the fecal flora of HFA-rats was devoid of *Salmonella* spp. and indigenous cefixime-resistant *Enterobacteriaceae*.

Transfer of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene to the intestine of HFA-rats in the absence of selective pressure (groups A and C). The *Enterobacteriaceae* population in groups A and C remained stable, at  $\sim 7 \log_{10}$  CFU/g, throughout the experiment.

In group A, levels of the donor *Salmonella enterica* Virchow strain reached  $6 \log_{10}$  CFU/g of feces on day 0 and decreased significantly to  $\sim 3 \log_{10}$  CFU/g of feces after two days ( $P < 0.001$ ) (Figure 1A). Eight days later, *S. enterica* Virchow was undetectable, although it was found to have persisted in one fifth of HFA-rats at the end of experiment. No transconjugants in endogenous *Enterobacteriaceae* were detected in the feces of any of the rats during the experiment. In group C, counts of the *E. coli* J5 recipient strain and the *S. enterica* Virchow donor strain were  $\sim 4 \log_{10}$  CFU/g and  $5.5 \log_{10}$  CFU/g of feces, respectively, on day 0 (Figure 1C). *E. coli* J5-transconjugants appeared rapidly after the introduction of the donor strain into all rats (data not shown) and its levels reached  $\sim 3 \log_{10}$  CFU/g of feces on day 0. The transfer rate was estimated at about  $7 (\pm 1.5) \times 10^{-1}$  transconjugants per donor and was very higher to the in vitro rate of  $5.9 (\pm 5.7) \times 10^{-8}$  (19). On day 2, a significant decrease in counts was observed for donor, recipient and transconjugant strains. As reported above, *S. enterica* Virchow was found to have persisted in one fifth of rats at the end of experiment.

Effect of antibiotic exposure on *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene transfer (groups B, D, E). In groups B, D and E, mean *Enterobacteriaceae* counts were significantly reduced, by  $\sim 2 \log_{10}$ , by treatment with cefixime or cefixime/clavulanic acid ( $P < 0.001$ ) (Figure 1B, 1D and 1E). After

treatment, *Enterobacteriaceae* counts returned to the initial levels of about  $7 \log_{10}$  CFU/g of feces in all groups of rats.

In group B, no *Enterobacteriaceae* transconjugants were detected in fecal samples from rats treated with cefixime (Figure 1B). The number of *Salmonella* counts in feces from all rats fell from about  $6 \log_{10}$  CFU/g of feces after inoculation to  $\sim 2 \log_{10}$  CFU/g at the end of the period of drug treatment. Two weeks after the end of treatment, donor strains continued to be detected in the feces of three of the five rats and bacterial counts were significantly higher than those for the rats of the control group ( $P < 0.03$ ) (group A). In groups D and E, *E. coli* J5 and *S. enterica* Virchow strain counts were  $\sim 5 \log_{10}$  CFU/g of feces on day 0 (Figure 1D and 1E). At the same time point, *E. coli* J5-transconjugant levels reached about  $3 \log_{10}$  CFU/g of feces. Transfer rates in both groups were similar to that in the control group, at  $\sim 7 \times 10^{-1}$  transconjugants per donor. Two days after the beginning of cefixime or cefixime/clavulanic acid treatment, the recipient and transconjugant populations rapidly decreased in size, becoming undetectable. *Salmonella* counts also decreased after drug administration in the feces of all rats, falling to below the detection threshold in the animals of group E, whereas donor strain levels were maintained at  $\sim 3 \log_{10}$  CFU/g of feces in the animals of group D. Two weeks after of the end of cefixime treatment, *Salmonella* was still present at countable levels in the feces of three of the five rats of this group.

Analysis of transconjugants. The 15 transconjugants isolated from the rats of groups C, D and E were identified as *E. coli* by PCR. All had PFGE profiles identical to the *E. coli* J5 strain used for inoculation (data not shown). The presence of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene was confirmed by PCR in all isolates. The antibiotic susceptibility of the transconjugants was assessed (Table 2). All transconjugants were resistant to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefixime, cefotaxime, ceftazidime, ceftiofur and cefuroxime, unlike the parental *E. coli* J5 strain. MIC values of amoxicillin/clavulanic acid were slightly higher in transconjugants than in the donor strain, whereas the MICs of ampicillin, cefotaxime, ceftazidime and ceftiofur were lower. However these values were still higher than those found in the parental strain. The cotransfer of other resistance genes, conferring resistance to nalidixic acid, streptomycin, tetracycline, trimethoprim, sulfamethoxazole or trimethoprim/sulfamethoxazole was not observed.

Determination of the cefixime fraction in fecal samples. Despite the quantification limit of 2.18 mg/kg, cefixime was not detected in feces samples from any of the treated HFA-rats.

## DISCUSSION

In the human flora-associated rat model, we detected no *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene transfer from *S. enterica* Virchow to the endogenous *Enterobacteriaceae*. Bourgeois-Nicolaos *et al.* (8) reported similar results, with no detection of *vanA* gene transfer from *E. faecium* to *E. faecalis* in an HFA-mouse model. There are several possible reasons for the lack of transfer to the indigenous flora *in vivo*. Firstly, for transfer to occur, large numbers of both the donor and recipient strains must be present simultaneously (28). Resistance by colonization to exogenous *Salmonella* or the production of inhibitory metabolites by the complex flora may decrease donor strain levels or even lead to elimination of the donor strain (29, 34). It is also difficult for exogenous strains to colonize the gut, due to competition with the highly adapted endogenous flora, and the presence of the plasmid-free strain would almost certainly have inhibited the establishment of the plasmid-bearing strain in control group (16). Secondly, a failure to observe transfer does not necessarily mean that no transfer occurred. This event may simply be undetectable due to its very low frequency. Licht *et al.* (29) showed that most plasmid transfer in the intestinal compartment occurs in the mucus layer. In the biofilm, this transfer initially occurs when the donor strain comes into contact with the recipients of the first layer, without transfer of the plasmid to recipients in lower layers (12). So, in our study, the viscous intestinal mucus may have supported the initial formation of mating pairs, as occurs in biofilms, whereas the subsequent formation of transconjugants seems to have been inhibited. This effect, combined with the peristaltic movement of the gut, resulted in severe limitation of plasmid transfer to the indigenous flora.

The addition of a recipient strain to the normal flora of HFA-rat, together with the donor strain of *Salmonella*, rapidly led to the appearance of transconjugants containing the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene in rat feces. This finding was already observed in axenic rats inoculated only with donor strain *Salmonella enterica* Virchow harbouring *bla*<sub>CTX-M9</sub> and recipient *E. coli* J5 (19). The similar PFGE profiles of the transconjugants and the recipient confirmed their close relationship to the parental *E. coli* J5 strain. Lester *et al.* (28), also observed that, in the absence of selective pressure, transfer of the *vanA* gene from an *E. faecium* strain of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin occurred in only three of six human volunteers receiving both strains. This event was also transient, as observed in our study. The elimination of these exogenous strains may be due to the effects of the barrier flora, the concentration of

exogenous strains or biochemical and physiological mechanisms operating in the intestine, as described above.

In our study, the administration of cefixime at therapeutic concentrations did not increase the transfer of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene between *S. enterica* Virchow and *E. coli* J5 and the number of transconjugants was not found to be higher when the selective pressure was removed. By contrast, Duval-Iflah *et al.* (17) observed the establishment of transconjugants in the dominant population and the replacement of the parental recipient strain during ampicillin administration in HFA-mice, even after the period of drug administration had ended. These discrepancies may result from differences in the plasmid incompatibility group and the ability to adapt to gastrointestinal conditions of the strains used, with the human modified strain *E. coli* J5 used here less able to adapt to the gastrointestinal environment than the human *E. coli* recipient used in the *in vivo* transfer experiment of Duval-Iflah *et al.* (13, 17, 20).

*E. coli* J5-transconjugants were also more susceptible to extended-spectrum cephalosporin than *S. enterica* Virchow (Table 2). A contribution of other unrelated mechanisms, such as mutations that account for porin deficiency and impaired permeability, could explain the substantially lower cephalosporin MICs of the transconjugants compared with those of the donor strain. Numerous reports have documented the decreased permeabilities for  $\beta$ -lactams in strains of the family *Enterobacteriaceae*, which is usually due to mutational changes in genes coding for outer membrane porins. This mechanism has been found to be sufficient to significantly influence the level of bacterial resistance to  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactam plus inhibitor combinations, especially when it coexists with various  $\beta$ -lactamases, including ESBLs (50). In addition, no cotransfer of other resistance determinants to transconjugants was observed. These findings have already been observed in our rat model colonized only with donor and recipient strain (19). Similar results were obtained by Novais *et al.* (37). The *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene of our donor strain is located in the class 1 integron In60 which contain gene cassettes responsible for the other resistance (excepted to nalidix acid) on a IncHI2 plasmid (20). In the literature, genetic divergence between plasmids carrying the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene and great variability in the genetic surrounding of this gene were described by several authors (23). This suggests a high rearrangement of these cassettes by integration or deletion in their receptor element. These events could lead to gene inactivation or silencing resulting in the lack of co-transfer detection as we observed in our conjugation study.

Cefixime treatment nevertheless had an effect on the reduction of indigenous *Enterobacteriaceae* population as demonstrated by Finegold *et al.* (21) and Nord *et al.* (35) and the persistence of *Salmonella* in treated rats in both trials. Indeed, at the end of the experiment, CTX-M-resistant strains were found to have persisted in a larger proportion of treated HFA-rats (3 of 5) than of rats in the control group (1 of 5). In the control group, the persistence of *Salmonella* spp. may be attributed to the variability individual of animals. Previous studies on the selection and persistence of antibiotic-resistant *Salmonella* spp. have indicated that antibiotic treatment increases the likelihood of the strain being maintained in the digestive tract (1, 38-40). As native *Enterobacteriaceae* may prevent the implantation of exogenous *Enterobacteriaceae*, the persistence of the CTX-M-*Salmonella* strain in our study may result from "substitution colonization" and proliferation of the strain in the digestive tract of rats in which the *Enterobacteriaceae* population had been disturbed by antibiotic treatment (25). We detected no cefixime in HFA-rat feces during treatment. However, the more than 2 log<sub>10</sub> decrease in *Enterobacteriaceae* counts during cefixime treatment in our study demonstrated that the antibiotic was present in the digestive tract of rats. According to the pharmacokinetic study of cefixime in rat, the bioavailability of cefixime was estimated at 30 % (data not shown) and comparable to the data previously described in rat and human (18, 44). So, the part excreted in gastrointestinal tract may be considered approximatively at 70 %. Based on these observations, we hypothesized that cefixime was hydrolyzed during transit by the  $\beta$ -lactamases-producing strains of anaerobic endogenous flora as previously described (11, 27, 46). We evaluated the impact of these  $\beta$ -lactamases by treating animals with cefixime together with clavulanic acid. However, cefixime was no more recovered in the feces of rats also treated with clavulanic acid. The only effect of adding clavulanic acid was an elimination rate of *Salmonella* counts similar to in control group, with no regrowth when antibiotic treatment was ended. Cefixime seems to be hydrolyzing by the endogenous  $\beta$ -lactamases of the flora even in the presence of clavulanic acid. The concentration of the both drugs appeared nevertheless to be more inhibitory towards *Salmonella* than cefixime alone.

To our knowledge, this is the first report dealing with a study on the transfer of a CTX-M-9 plasmid carried by a strain of animal origin to the human intestinal flora. The lack of detection of transfer between *S. enterica* Virchow and the *Enterobacteriaceae* of the human flora does not exclude the possibility of such an event taking place but suggests that such events were rare. However, in the presence of an exogenous recipient strain, the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene was transferred with a high frequency, although this colonization was only transient.

Cefixime treatment favored the establishment of resistant *S. enterica* Virchow, therapy potentially serious public health problem jeopardizing treatment and constituting an important reservoir of the resistance gene in the human digestive tract. In conclusion, the spread of resistance genes from strains of animal origin to human intestinal flora strains does not appear to occur easily even in selective pressure.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the animal keepers, Marteau S. and Rolland J.G., and technical assistants Louapre P. and Poirier C. from AFSSA-Fougeres for their help. We thank also D. Meunier from AFSSA-Lyon for her involvement in the project.

#### FUNDING

This work was supported by internal funding and a grant from the Brittany region.

#### TRANSPARENCY DECLARATIONS

No conflict of interest to declare.

## REFERENCES

1. **Adamczyk, M., and G. Jagura-Burdzy.** 2003. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochim Polonica* **50**:425-53.
2. **Bej, A. K., J. L. DiCesare, L. Haff, and R. M. Atlas.** 1991. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1013-7.
3. **Bej, A. K., S. C. McCarty, and R. M. Atlas.** 1991. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2429-32.
4. **Bertrand, S., F. X. Weill, A. Cloeckaert, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemaue, C. Godard, P. Butaye, H. Imberechts, P. A. Grimont, and J. M. Collard.** 2006. Clonal emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J Clin Microbiol* **44**:2897-903.
5. **Blake, D., K. Hillman, D. Fenlon, and J. Low.** 2003. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *J. Appl. Microbiol.* **95**:428-36.
6. **Bonner, J.** 1997. Hooked on Drugs: Farm animals given antibiotics need less food to grow. *New Scientist*:24-7.
7. **Bou, G., M. Cartelle, M. Tomas, D. Canle, F. Molina, R. Moure, J. Eiros, and A. Guerrero.** 2002. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14  $\beta$ -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4030-4036.
8. **Bourgeois-Nicolaos, N., C. Moubareck, N. Mangeney, M.-J. Butel, and F. Doucet-Populaire.** 2006. Comparative study of *vanA* gene transfer from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis* and to *Enterococcus faecium* in the intestine of mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**:27-33.
9. **Canton, R., T. Coque, and F. Baquero.** 2003. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Infect Dis* **16**:315.
10. **Canton, R., and T. M. Coque.** 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Microbiol* **9**:466-75.
11. **Chachaty, E., C. Bourneix, S. Renard, M. Bonnay, and A. Andremont.** 1993. Shedding of *Clostridium difficile*, fecal  $\beta$ -lactamase activity, and gastrointestinal symptoms in 51 volunteers treated with oral cefixime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1432-1435.
12. **Christensen, B., C. Sternberg, J. Andersen, L. Eberl, S. Moller, M. Givskov, and S. Molin.** 1998. Establishment of New Genetic Traits in a Microbial Biofilm Community. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2247-55.
13. **Coleman, W., P. Goebel, and L. Leive.** 1977. Genetic analysis of *Escherichia coli* O111: B4, a strain of medical and biochemical interest. *J. Bacteriol.* **130**:656-660.
14. **Coque, T. M., A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Canton, and P. Nordmann.** 2008. Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* **14**:195-200.
15. **Denton, M.** 2007. *Enterobacteriaceae*. *int J Antimicrob Agents* **29**:9-22.

16. **Duval-Iflah, Y., P. Raibaud, and M. Rousseau.** 1981. Antagonisms among isogenic strains of *Escherichia coli* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Infect. Immun.* **34**:957-69.
17. **Duval-Iflah, Y., P. Raibaud, C. Tancrede, and M. Rousseau.** 1980. R-plasmic transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo* in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. *Infect. Immun.* **28**:981-90.
18. **Duverne, C., A. Bouten, A. Deslandes, J. Westphal, J. Trouvin, R. Farinotti, and C. Carbon.** 1992. Modification of cefixime bioavailability by nifedipine in humans: involvement of the dipeptide carrier system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2462-2467.
19. **Faure, S., Perrin-Guyomard, A., Delmas, J.M, Laurentie, M.** 2009. Impact of therapeutic treatment with  $\beta$ -lactam on transfer of the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> resistance gene from *Salmonella enterica* Virchow to *Escherichia coli* in gnotobiotic rats. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).
20. **Fernández, A., A. Cloeckert, A. Bertini, K. Praud, B. Doublet, F. Weill, and A. Carattoli.** 2007. Comparative Analysis of IncHI2 Plasmids Carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> or *bla*<sub>CTX-M-9</sub> from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strains Isolated from Poultry and Humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4177-4180.
21. **Finegold, S., L. Ingram-Drake, R. Gee, J. Reinhardt, M. Edelstein, K. MacDonald, and H. Wexler.** 1987. Bowel flora changes in humans receiving cefixime (CL 284,635) or cefaclor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:443-446.
22. **Galanakis, E., M. Bitsori, S. Maraki, C. Giannakopoulou, G. Samonis, and Y. Tselentis.** 2007. Invasive non-typhoidal salmonellosis in immunocompetent infants and children. *Int. J Infect. Dis.* **11**:36-9.
23. **Garcia, A., F. Navarro, E. Miro, B. Mirelis, S. Campoy, and P. Coll.** 2005. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*(CTX-M-9) gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:819-26.
24. **Hasman, H., D. Mevius, K. Veldman, I. Olesen, and F. M. Aarestrup.** 2005.  $\beta$ -Lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:115-21.
25. **Hudault, S., J. Guignot, and A. Servin.** 2001. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* **49**:47-55.
26. **Lavilla, S., J. Gonzalez-Lopez, E. Miro, A. Dominguez, M. Llagostera, R. Bartolome, B. Mirelis, F. Navarro, and G. Prats.** 2008. Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:1244.
27. **Leonard, F., A. Andremont, B. Leclerq, R. Labia, and C. Tancrede.** 1989. Use of  $\beta$ -lactamase-producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization. *J. infect. dis.* **160**:274-280.
28. **Lester, C. H., N. Frimodt-Moller, T. L. Sorensen, D. L. Monnet, and A. M. Hammerum.** 2006. *In vivo* transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:596-9.
29. **Licht, T. R., B. B. Christensen, K. A. Kroghelt, and S. Molin.** 1999. Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiol.* **145**:2615-22.

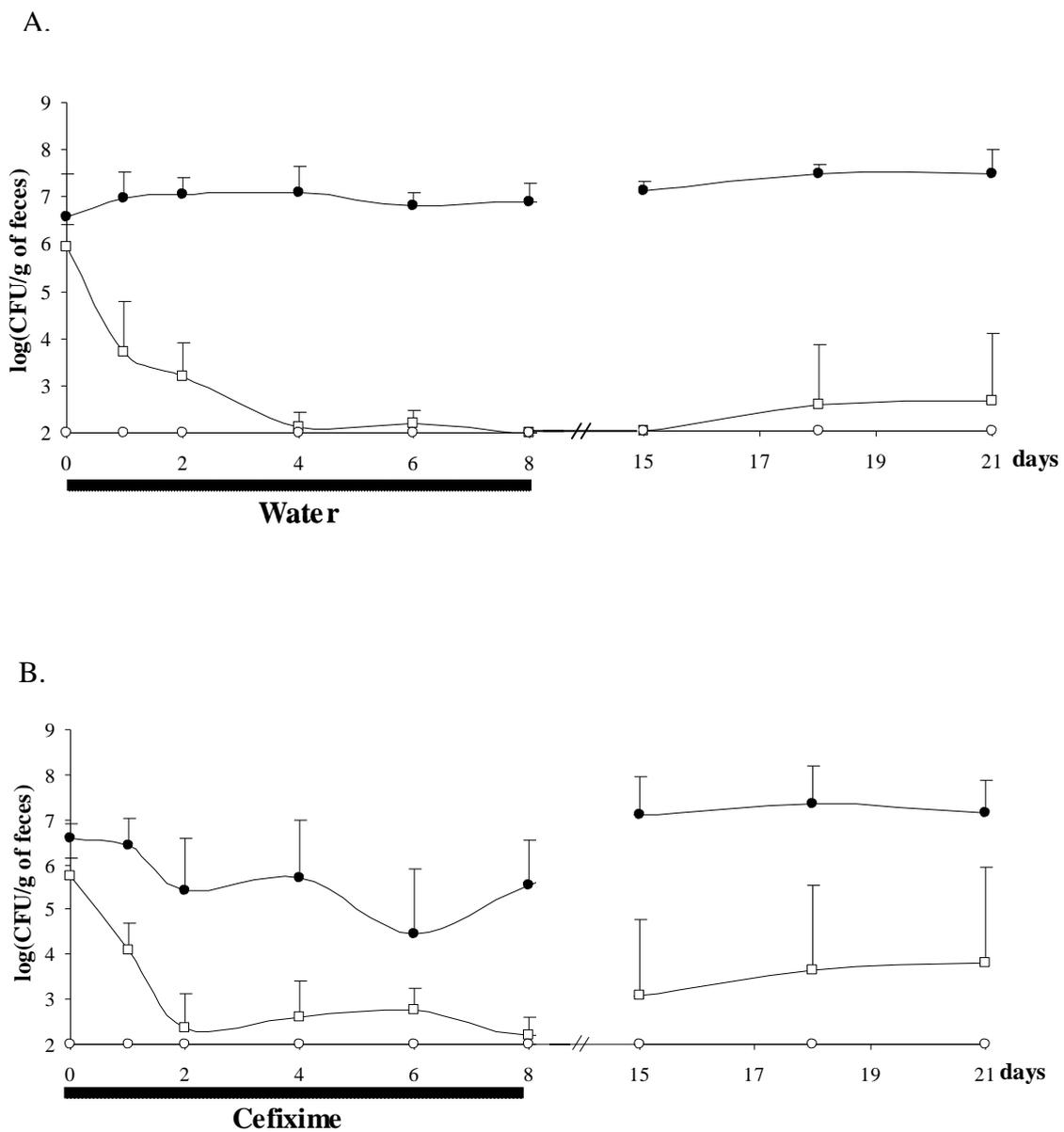
30. **Mendonca, N., J. Leitao, V. Manageiro, E. Ferreira, and M. Canica.** 2007. Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1946-55.
31. **Meng, F., X. Chen, Y. Zeng, and D. Zhong.** 2005. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of cefixime in human plasma: application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B.* **819**:277-82.
32. **Mesa, R., V. Blanc, A. Blanch, P. Cortes, J. Gonzalez, S. Lavilla, E. Miro, M. Muniesa, M. Saco, and M. Tortola.** 2006. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:211.
33. **Meunier, D., E. Jouy, C. Lazizzera, M. Kobisch, and J.-Y. Madec.** 2006. CTX-M-1- and CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *J. Antimicrob. Agents* **28**:402-7.
34. **Moubareck, C., M. Lecso, E. Pinloche, M. J. Butel, and F. Doucet-Populaire.** 2007. Inhibitory impact of bifidobacteria on the transfer of  $\beta$ -lactam resistance among *Enterobacteriaceae* in the gnotobiotic mouse digestive tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:855-60.
35. **Nord, C., G. Movin, and D. Stålberg.** 1988. Impact of cefixime on the normal intestinal microflora. *Scandinavian J. infect. dis* **20**:547.
36. **Novais, A., R. Canton, R. Moreira, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2007. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:796-9.
37. **Novais, A., R. Canton, A. Valverde, E. Machado, J.-C. Gala, L. Peixe, A. Carattoli, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2006. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1, and IncFI groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2741-50.
38. **Perrin-Guyomard, A., S. Cottin, D. Corpet, J. Boisseau, and J. Poul.** 2001. Evaluation of Residual and Therapeutic Doses of Tetracycline in the Human-Flora-Associated (HFA) Mice Model. *Regul.Toxicol. Pharmacol.* **34**:125-36.
39. **Perrin-Guyomard, A., J. Poul, D. Corpet, P. Sanders, A. Fernández, and M. Bartholomew.** 2005. Impact of residual and therapeutic doses of ciprofloxacin in the human-flora-associated mice model. *Regul.Toxicol. Pharmacol.* **42**:151-60.
40. **Perrin-Guyomard, A., J. Poul, M. Laurentie, P. Sanders, A. Fernández, and M. Bartholomew.** 2006. Impact of ciprofloxacin in the human-flora-associated (HFA) rat model: Comparison with the HFA mouse model. *Regul.Toxicol. Pharmacol.* **45**:66-78.
41. **Prats, G., B. Mirelis, E. Miró, F. Navarro, T. Llovet, J. Johnson, N. Camps, Á. Domínguez, and L. Salleras.** 2003. Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with salmonellosis. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:1273-1280.
42. **Prescott, J.** 2000. Antimicrobial Drugs: Miracle Drugs or Pig Feed. *Adv Pork Prod* **11**:37-45.
43. **Rodriguez-Bano, J., L. Lopez-Cerero, M. D. Navarro, P. D. de Alba, and A. Pascual.** 2008. Faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother.* **62(5)**:1142-9.
44. **Sakamoto, H., T. Hirose, and Y. Mine.** 1985. Pharmacokinetic of FK037 in rats and dogs. *J. Antibiot. (Tokyo)* **38**:496-504.

45. **Schjorring, S., C. Struve, and K. A. Krogfelt.** 2008. Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**:1086-93.
46. **Stark, C., C. Edlund, M. Hedberg, and C. Nord.** 1995. Induction of  $\beta$ -lactamase production in the anaerobic microflora by cefoxitin. *Clin. Infect. Dis.* :350-351.
47. **Su, L. H., C. Chu, A. Cloeckaert, and C. H. Chiu.** 2008. An epidemic of plasmids? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**:155-68.
48. **Trémolières, F., R. Azarian, F. Lebas, C. Mayaud, P. Carré, and J. Micolle.** 2000. Efficacy and tolerance of two oral dosages of Augmentin® 1 g/125 mg twice a day versus 500 mg/125 mg thrice a day in acute exacerbations of chronic bronchitis. A multi-center comparative randomized double blind study. *Med. Malad. Infect.* **30**:630-640.
49. **Weill, F. X., R. Lailier, K. Praud, A. Kerouanton, L. Fabre, A. Brisabois, P. A. Grimont, and A. Cloeckaert.** 2004. Emergence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5767-73.
50. **Yang, D., Y. Guo, and Z. Zhang.** 2009. Combined Porin Loss and Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Production is Associated with an Increasing Imipenem Minimal Inhibitory Concentration in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Curr. microbiol.* **58**:366-70.

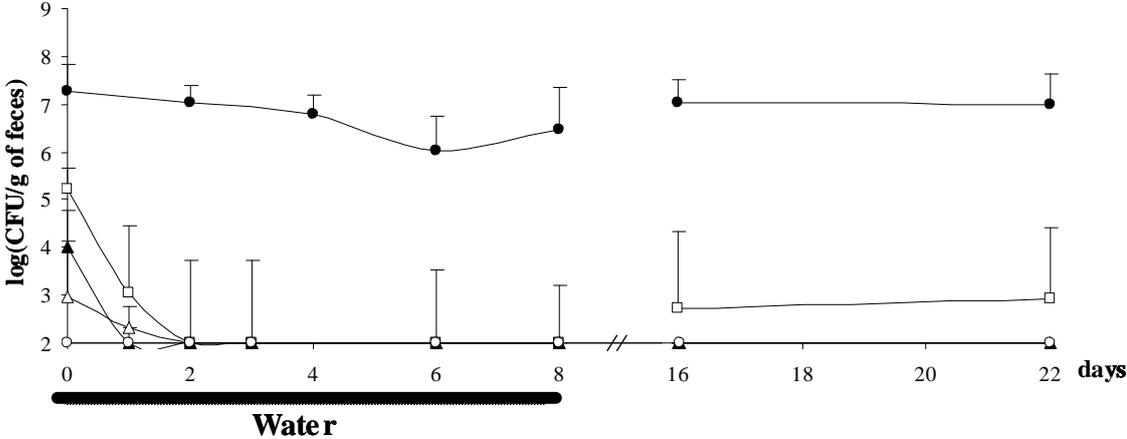
Table 1. Overview of the experimental design

<i>Groups</i>	<i>Donor strain</i>	<i>Recipient strain</i>	<i>Treatment</i>	<i>Cefixime dose (mg/kg)</i>
A	<i>S. enterica</i> Virchow	-	water	-
B	<i>S. enterica</i> Virchow	-	cefixime	8
C	<i>S. enterica</i> Virchow	<i>E. coli</i> J5	water	-
D	<i>S. enterica</i> Virchow	<i>E. coli</i> J5	cefixime	8
E	<i>S. enterica</i> Virchow	<i>E. coli</i> J5	cefixime/ clavulanic acid	8

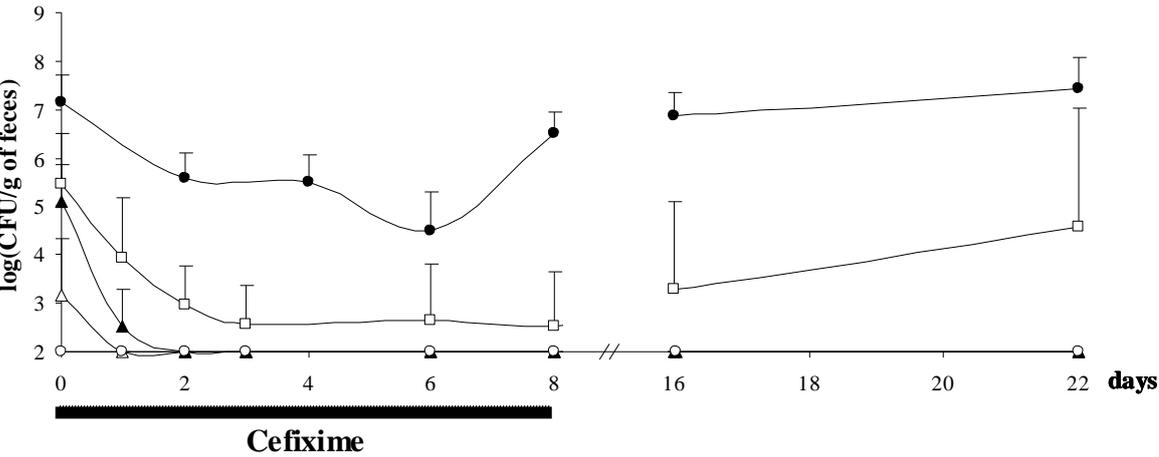
Figure 1. Bacterial counts in HFA-rat feces inoculated with *S. enterica* Virchow (A and B) and *E. coli* J5 (C, D and E). Animals were treated with sterile water (A and C), cefixime (B and D) or both cefixime and clavulanic acid (E). ●, total *Enterobacteriaceae*; □, *S. enterica* Virchow 3464b; ▲ *E. coli* J5; Δ, *E. coli* J5 transconjugants. The bar under the x-axis represents the time of treatment. Values are the means of results and error bars represent the standard deviation.



C.



D.



E.

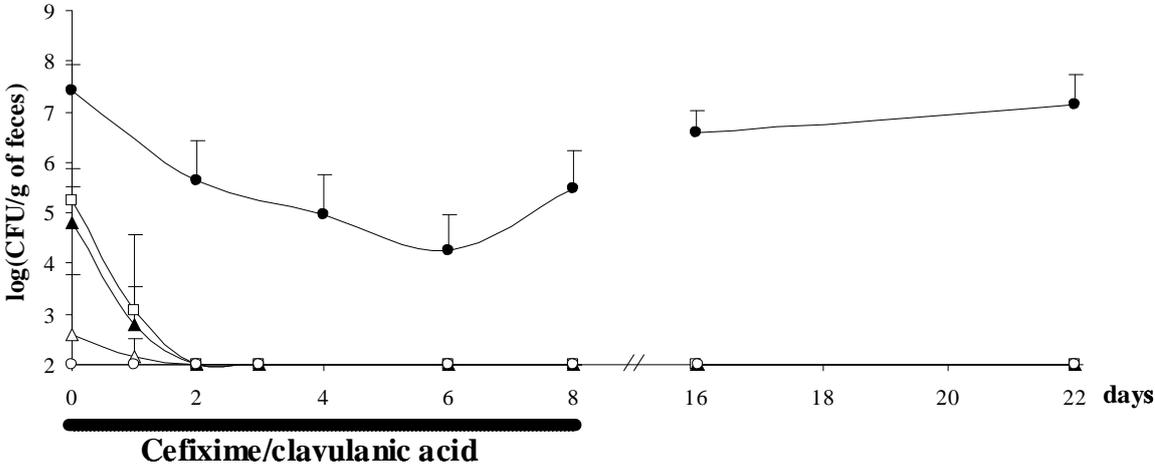


Table 2. Susceptibility of strains

Antibiotics	<i>E. coli</i> ATCC 25922		Donor <i>S. enterica</i> Virchow 3464b		Recipient <i>E. coli</i> J5		<i>E. coli</i> J5 transconjugants <sup>a</sup>					
	S	(4)b	R	(8)	S	(4)	control	cefixime	cefixime/clavulanic acid	S	(8-32)	R
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>d</sup>	S	(4)b	R	(8)	S	(4)	R	(16)	R	(8-32)	R	(8-16)
Ampicillin <sup>d</sup>	S	(4)	R	(128)	S	(4)	R	(16)	R	(16-32)	R	(16)
Cefixime <sup>d</sup>	S	(0.125)	R	(8)	S	(0.125)	R	(8)	R	(8)	R	(8)
Cefotaxime <sup>c</sup>	S	(0.03)	R	(> 8)	S	(0.03)	R	(0.5)	R	(0.5)	R	(0.5)
Cefoxitin <sup>c</sup>	S	(4)	R	(16)	S	(4)	R	(8-32)	R	(16)	R	(32-128)
Ceftazidime <sup>c</sup>	S	(0.125)	R	(8)	S	(0.125)	R	(1-4)	R	(1)	R	(1)
Ceftiofur <sup>c</sup>	S	(0.25)	R	(> 8)	S	(0.25)	R	(1-8)	R	(1)	R	(1)
Cefuroxime <sup>c</sup>	S	(2)	R	(> 32)	S	(2)	R	(16-32)	R	(8-16)	R	(16-32)
Nalidixic acid <sup>d</sup>	S	(4)	R	(256)	S	(4)	S	(4)	S	(4)	S	(4)
Streptomycin <sup>d</sup>	S	(2)	R	(128)	S	(2)	S	(2)	S	(2)	S	(2)
Sulfamethoxazole <sup>d</sup>	S	(8)	R	(> 512)	S	(8)	S	(4-8)	S	(4-8)	S	(4-8)
Tetracycline <sup>d</sup>	S	(1)	R	(64)	S	(1)	S	(2-4)	S	(2)	S	(4)
Trimethoprim <sup>d</sup>	S	(0.5)	R	(> 64)	S	(0.5)	S	(0.5)	S	(0.5-2)	S	(1)
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole <sup>d</sup>	S	(< 1)	R	(> 16)	S	(< 1)	S	(1)	S	(1)	S	(1)

<sup>a</sup> Five of 15 *E. coli* J5 transconjugants isolated from animals treated with water (control), cefixime or cefixime/clavulanic acid were tested to determine the MICs of antibiotics.

<sup>b</sup> Minimal inhibitory concentrations (MICs) expressed in µg/ml are indicated in parentheses.

<sup>c,d</sup> Strains are classified as susceptible (S) or resistant (R) on the basis of EUCAST<sup>c</sup> or CLSI<sup>d</sup> criteria.

### **ARTICLE 3**

**Etude Pharmacocinétique-Pharmacodynamique du céfixime vis-à-vis de *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* Virchow productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu**

*International Journal of Antimicrobial Agents (en préparation)*

## OBJECTIF

Au cours d'une antibiothérapie, l'acquisition de déterminant de la résistance et la sélection de sous-populations résistantes chez un patient initialement infecté par une souche sensible, présente un important problème. Le but de cette étude est d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du céfixime vis-à-vis de souches d'*Escherichia coli* sensibles au céfixime, *Salmonella enterica* Virchow et des souches *E. coli* ayant acquis un gène de résistance au céfixime par conjugaison *in vivo*.

## MATERIELS ET METHODES

**L'activité bactéricide du céfixime** est déterminée selon la technique des cinétiques de bactéricidie vis-à-vis de dix souches bactériennes de sensibilité distinctes : *S. enterica* Virchow résistante au céfixime (CMI, 8 mg/l), *E. coli* J5 sensible au céfixime (CMI, 0.125 mg/l) et huit souches d'*E. coli* J5 résistante au céfixime (CMI, 4-8 mg/l). Les transconjugants *E. coli* J5 proviennent des prélèvements issus de la phase expérimentale de l'article 1. Les cinétiques de bactéricidie ont été déterminées par la technique de microdilution. Douze concentrations de céfixime ont été testées dont trois au dessous de la CMI et 8 au dessus de la CMI des souches. Les dénombrements bactériens sont effectués à 0, 2, 4, 6, 8 et 24 h.

**L'étude pharmacocinétique du céfixime** a été réalisée sur 6 rats avec un cathéter placé dans la veine fémorale gauche (Annexe 2). Le plan expérimental a été un cross-over avec un temps de wash-out de 4 jours. Chaque rat a reçu 4 mg/kg de céfixime par voie orale et par voie intraveineuse. Les prélèvements de sang ont été réalisés *via* le cathéter et transvasés dans un tube hépariné à 0, 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 h après l'administration par voie intraveineuse et 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, et 24 h après l'administration par voie orale. Les concentrations plasmatiques de céfixime ont été déterminées par CL-MS après extraction. Les concentrations plasmatiques de céfixime en fonction du temps ont été analysées à l'aide d'une approche non compartimentale.

Le temps pendant lequel la concentration plasmatique du céfixime est au dessus de la CMI (T>CMI) est calculée pour chaque rat. Une simulation des T>CMI est également réalisée avec différentes posologies : 4 mg/kg toutes les 8 h, 10 h, 12 h.

## RESULTATS

Avec la souche *E. coli* J5, un effet bactéricide du céfixime est obtenu à partir de 1 mg/l, avec une baisse de 7 log<sub>10</sub> à 24h. Avec *S. enterica* Virchow et les transconjugants *E. coli* J5, le céfixime doit être en contact avec la bactérie à une concentration de 1 024 mg/l et 16 mg/l, respectivement, pour exercer un effet bactéricide. L'activité bactéricide du céfixime est définie comme temps-dépendent.

Suite à l'administration de 4 mg/kg de céfixime *per os*, un pic des concentrations plasmatiques de 1.5 mg/l est atteint à 1.7 h. La biodisponibilité absolue est de l'ordre de 25 %.

Lorsque les rats reçoivent 4 mg/kg de céfixime par voie orale, le T>CMI vis-à-vis de la souche sensible *E. coli* J5 atteint 48 %. Pour les posologies de 4 mg/kg toutes les 8 h, 10 h, 12 h, les T>CMI sont approximativement de 85 %. Concernant les souches résistantes, la concentration maximale de céfixime atteinte dans le plasma après une administration orale est insuffisante pour permettre de mesurer le T>CMI.

## CONCLUSION

Ces résultats suggèrent que le céfixime peut être efficace lorsque la bactérie cible est une souche sensible. Néanmoins, lorsque la souche pathogène est résistante ou acquiert la résistance au cours du traitement, la posologie de 4 mg/kg à 12 h d'intervalle est inadaptée. Une alternative serait l'augmentation de la dose, l'administration du céfixime par voie intraveineuse ou encore l'administration du céfixime combiné avec de l'acide clavulanique.

**Pharmacokinetic-Pharmacodynamic of cefixime against *Escherichia coli* and *Salmonella* strains producing Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase (ESBL)**

S. Faure, J.M. Delmas, P. Louapre, J. Manceau, J.G. Rolland, S. Marteau, M. Laurentie\*

Laboratory for the Research and Investigation of Veterinary Drugs and Disinfectants,  
Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Unit, AFSSA Fougères, BP 90203, La Haute Marche,  
35133 Javené, France.

\* Corresponding author. Tel.: 33(2)-99-94-78-78; fax: 33(2)-99-94-78-99

E-mail address: [m.laurentie@afssa.fr](mailto:m.laurentie@afssa.fr)

**Abstract**

Acquisition of a resistance determinant and the selection of resistant subpopulations during treatment of patient initially infected by susceptible strain present an important problem. The aim of this study was to investigate the pharmacokinetic/pharmacodynamic indices of cefixime against cefixime-resistant *Salmonella enterica* Virchow, cefixime-susceptible *Escherichia coli* and eight resistant-cefixime *E. coli* transconjugants acquiring the cefixime resistance determinant by conjugal transfer *in vivo*. Bactericidal activity of cefixime was tested in time-kill experiment and related to the pharmacokinetic profile of oral cephalosporin cefixime in animal model of rat and compared to human. The time above MIC (T>MIC) for cefixime at 4 mg/kg against *E. coli* (MIC, 0.125 mg/l) was 48 % and for a regimen of 4 mg every 8, 10 and 12 h T>MIC was approximately 85 %. For *S. enterica* Virchow (MIC, 8 mg/l) and *E. coli* transconjugants (MIC, 4 to 8 mg/l), T>MIC was 0%. These data suggest that cefixime selection of resistant bacteria may easily occur if dosing regimens are only targeted toward fully susceptible strains.

## 1. Introduction

The rapid dissemination of antibiotic resistance in bacteria, combined with a decreasing interest from the pharmaceutical industry in developing new antibiotics, has created a major public health problem. As a result, activities to maintain the effects of existing antibiotics and thereby prolong their useful life span have a high priority. However, the knowledge of how to use existing antibiotics to minimize the emergence and selection of resistance without compromising efficacy is today inadequate. Among the most frequently used antibiotics to treat severe infections caused by Gram-negative pathogens are  $\beta$ -lactams, such as penicillins and cephalosporins.

After the introduction of extended spectrum cephalosporin for clinical use, plasmid-mediated extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) enzyme was described. Until the late 1990s, TEM and SHV types were the predominant ESBLs. Horizontal transfer of resistance genes led to a rapid interspecies spread of resistance, and today, CTX-M is the most prevalent plasmid-mediated ESBL found in gram-negative organisms [1-3]. The ability of this resistance determinant to transfer between bacteria during treatment of patient initially infected by susceptible strain represents an important problem of public health. A case of treatment failure due to the emergence of resistance to ceftriaxone in *Salmonella enterica* serotype Anatum was reported by Su *et al.* [4]. The emergence of resistance to ceftriaxone in *S. enterica* serotype Anatum during the ceftriaxone treatment was due to the *in vivo* acquisition of a plasmid containing the *bla*<sub>CTX-M-3</sub> gene and caused the treatment failure in this patient. In hospital and community-acquired infections, antibiotic is often prescribed empirically and prior to laboratory identification including ESBL production. For this reason, the prolonged bacterial exposure to sub-optimal antibiotic may select and favour colonization of resistance bacteria. Several studies of animals and *in vitro* models have examined the effect of different dosing regimens in order to suppress the resistant subpopulations [5,6]. For  $\beta$ -lactam antibiotics, currently the pharmacodynamic indices predicting the efficacy of bacterial killing are the duration of time with concentration higher than the minimal inhibitory concentration (MIC) ( $T > MIC$ ) [7,8]. Nevertheless, the efficacy predictive was often determined with susceptible strains and necessitates to assess in presence of resistance strains. The aim of this investigation was to describe the pharmacokinetic profile of oral cephalosporin cefixime and the bactericidal activity of cefixime against cefixime-resistant *Salmonella enterica* Virchow, cefixime-susceptible

*Escherichia coli* and resistant-cefixime *E. coli* acquiring the cefixime resistance by conjugal transfer *in vivo*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains

The ten different bacterial strains used in our experiment are listed in table 1. Recipient *Escherichia coli* J5 was rifampicin-resistant and cefixime susceptible. The donor *Salmonella enterica* Virchow strain harbouring a plasmid mediated *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene was resistant to cefixime and susceptible to rifampicin [9]. Eight cefixime and rifampicin resistant *E. coli* J5 (p3464b) transconjugants were obtained from the *in vivo* conjugation experiment. The detailed transfer study protocol has been described previously (article 1). Briefly, ten rats were inoculated orally with 10<sup>8</sup> CFU of recipient *E. coli* J5 strains and one week later, with 10<sup>8</sup> CFU of donor *S. enterica* Virchow strains. One week after the inoculation of the donor strain, five animals were orally treated with cefixime (4 mg/kg body weight) twice daily for 8 days. The control group of five animals was given the sterile water. Fresh fecal samples were collected from each rat before and after treatment. The 10-fold appropriate serial dilutions of the fecal samples were plated on selective agar media for donor, recipient and transconjugants enumeration. Four *E. coli* J5 (p3464b) transconjugants were isolated from fecal rats 7 days after treatment with cefixime and four transconjugants were obtained from control group.

### 2.2. Antibiotic

Experiments carried out in the pharmacodynamic and pharmacokinetic studies excepted the oral administration, were performed using cefixime trihydrate obtained from Sigma-Aldrich, France. The antibiotic was dissolved in phosphate buffer (pH 7.2, 0.1M) on the day of use and diluted in phosphate buffer or Mueller-Hinton Broth (MHB). For the pharmacokinetic study, cefixime speciality (Oroken® 100 mg, Sanofi-Aventis, France) was used for the oral administration. The antibiotic was reconstituted according to the manufacturer's instructions by adding water to obtain a concentration of 20 g/L and stored at 21°C for one week.

### 2.3. Microbiological data

The MIC of cefixime was determined by application on an E-test strip on Mueller Hinton agar according to the instructions of the manufacturer (AB BIODISK, Sweden) and interpretative criteria proposed by CLSI [10]. *E. coli* ATCC 25922 was used as quality control.

The killing curves were determined using the microdilution method with a final broth volume of 1 ml. Each strain was grown in MHB at 37°C for 24 h. The overnight culture of bacteria was calibrated with 0.5 Mc Farland standard and inoculated in MHB to obtain a final concentration of  $10^7$  CFU/ml. The range antibiotic concentrations tested were determined in order to observe the effect of twelve different concentrations including three concentrations below and eight concentrations above the CMI. Immediately after inoculation, a 100 µl aliquot of antibiotic was added to 900 µl of the bacterial suspension. All tubes were incubated at 37°C, and sampling for colony count was performed at 0, 2, 4, 6, 8 and 24 h. Viable counts in suspensions were determined in triplicate on MHB supplemented with activated charcoal and magnesium sulphate. The  $\log_{10}$  of counts in CFU/ml was plotted against time for each concentration of cefixime tested. A bactericidal effect was defined as a decrease of  $\geq 3 \log_{10}$  (99.99 %) in the number of strains observed in control assay. Killing rates were obtained by linear regression over log transformed CFU counts versus time during the earliest period of 6 h.

#### 2.4. Animals and experimental design

Animal experiments were performed according to the French law and followed ethical and welfare recommendations. A cross-over design corresponding at a successive treatment to the same animal was used in the present experiment. Six male Sprague Dawley rats (250 g) with a polyethylene catheter placed in the left femoral vein were obtained from Janvier, France. Ten days after their arrival, individual body weights were determined on the day before test article administration (day-1) in order to calculate individual doses. On the day of dosing (day 0), the group A (3 rats) were treated *per os* (*p.o.*) with Oroken® at 4 mg/kg BW. The group B (3 rats) received by intravenous (*i.v.*) route via the femoral catheter, 4 mg/kg BW of cefixime trihydrate. Samples of blood (~ 200 µl) in both groups were obtained from catheter implanted in the left femoral vein by puncture and collected in glass vacuum tubes containing sodium heparin (Becton Dickinson, Grenoble, France) at 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h post-administration (*i.v.*) and 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8,

and 24 h post-administration (*p.o.*). The blood samples were chilled in wet ice and centrifuged within 1 h of collection at  $3000 \times g$  for 10 min. The plasma was removed and stored below  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. In a cross-over design, a wash out period of 10 times the terminal half-life (3.5 h) [11] *i.e.* 2 days was required to avoid any differential carry-over. In this way, four days after the last blood sample, group A was treated by intravenous injection with 4 mg/kg BW of cefixime while group B received by gavage 4 mg/kg BW of Oroken. The blood sampling procedure was performed as in first period.

### 2.5. Determination of cefixime concentrations

An antibiotic concentration was determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method adapted from Meng *et al.* [12]. To a 0.2 ml aliquot of plasma sample, 10  $\mu\text{l}$  of internal standard (10 mg/l cephalexin (Sigma, France)) and 100  $\mu\text{l}$  of methanol were added. The sample mixture was deproteinized with 300  $\mu\text{l}$  of acetonitrile and vortex-mixed for approximate 20 s, allowed to stand for 5 min, and the precipitate was removed by centrifugation at  $20,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Then 200  $\mu\text{l}$  of supernatant was transferred and evaporated to dryness at  $40^{\circ}\text{C}$  under a gentle stream of azote. The dry residue was reconstituted in 200  $\mu\text{l}$  of the mobile phase, and then vortex-mixed. The solution was removed by centrifugation at  $20,000 \times g$  for 5 min at  $20^{\circ}\text{C}$ . The supernatant phase resultant was injected onto the LC-MS system for analysis. The method was validated between 20 and 10,000 ng/l. The lower limit of quantification (LOQ) was 20 ng/l. The repeatability (intra-assay precision) was 2.25 % and 1.01 % for Quality Control (QC) samples at 20 and 10,000 ng/l, respectively. The intermediate precision (inter-assay precision) was 2.30 % and 1.44 % for the QC samples at 20 and 10,000 ng/l. The antibiotic stability was investigated for under experimental condition. Dilutions of cefixime (8 mg/l) in sterile broth were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Samples were collected after 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 24 h, and concentrations were determined as described above. Degradation of cefixime in sterile water, phosphate buffer and sterile broth was not observed.

### 2.6. Pharmacokinetic analysis

Both compartmental and statistical moment approaches were used for analysis plasma concentration. These analysis were performed with WinNonlin 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA, USA).

### 2.6.1. Compartmental analysis

Plasma concentration versus time after *i.v.* or *p.o.* drug administrations were fitted with poly-exponential equation and the model corresponding was selected by application of Akaike's Information Criterion [13]. The parameters were estimated by non-linear regression. The data points were weighted with the inverse of the squared fitted value. For oral administration the presence of lag-time was tested. Secondary parameters as elimination half-life, volumes and clearance were calculated by classical equations [14].

### 2.6.2. Statistical moment approach (SMA)

The area under the curve  $AUC_{(0-last)}$  was calculated using the linear trapezoidal rule with extrapolation to infinity. The extrapolation  $AUC_{(clast-inf)}$  was performed using the following equation:

$$AUC_{(clast-inf)} = C_{last} / \lambda_{iv} \quad \text{Equation (1)}$$

where  $C_{last}$  is the last observed blood concentration and  $\lambda_{iv}$  the slope of the terminal phase. The terminal slope was estimated from the linear part of the terminal phase by at least four points and was accepted for a coefficient of determination ( $r^2 > 0.95$ ). The extrapolated part of AUC was always < 10 % of the total area. The Mean Residence Time (MRT) was calculated using the linear trapezoidal rule between 0 and  $C_{last}$  or with extrapolation to infinity. Clearance and  $V_{\beta}$  i.e the volume of distribution of the terminal phase were also estimated.

For *p.o.* administration the observed maximum concentration ( $C_{max}$ ) and the corresponding time were obtained from the concentration-time profile and compared to those obtained in compartmental analysis. Bioavailability factor was defined according to the formula [15]:

$$F = [(AUC_{(0-inf)})_{p.o.} \times (Dose)_{i.v.} / (AUC_{(0-inf)})_{i.v.} \times (Dose)_{p.o.}] \times 100 \quad \text{Equation (2)}$$

where  $(AUC_{(0-inf)})_{p.o. \text{ or } i.v.}$  represents the area under concentration-time curve after oral or intravenous administration of cefixime and  $(Dose)_{p.o. \text{ or } i.v.}$  represents the really dose administered by oral or intravenous route. From  $MRT_{(o-inf)}$ , the mean absorption time (MAT) was calculated by the following equation (3):

$$MAT_{(o-inf)} = MRT_{po (o-inf)} - MRT_{iv (o-inf)} \quad \text{Equation (3)}$$

### 2.7. PK-PD simulation analysis

The best model obtained from described the plasma concentration vs time profile after oral administration was used to simulate plasma concentration-time profiles for different dosing regimen of cefixime: 4 mg every 8h (q8), every 10h (q10) and every 12h (q12). These profiles were therefore combined with pharmacodynamic parameters obtained from sensible or resistant bacteria. The pharmacodynamic parameters used was the percentage time above the MIC in 24h ( $\% T > MIC$ ) as recommended by some authors [7,8,16].  $\% T > MIC$  was determined for each dosage regimen (4 mg q8, q10, q12).

### 2.8. Statistical analysis

Pharmacokinetic parameters are expressed as arithmetic mean and its standard deviation except for half-life where harmonic mean and its standard deviation was calculated [17]. The statistical analysis was conducted using SYSTAT Version 12.0 for Windows. The pharmacokinetic parameters were compared with parameters of human obtained from the medical literature [18]. Although the lack of raw data, comparison of human and rat parameters was performed by a t test comparison with a level of significance of 0.05.

### 3. Résultats

#### 3.1. Pharmacokinetic analysis

The semi-logarithmic plots of the mean  $\pm$  standard deviation for plasma concentrations vs time of cefixime after intravenous and oral administration are shown in figure 1. For *i.v.* administration a tri-exponential equation was selected:

$$C(t) = Y_1 \exp(-\lambda_1 t) + Y_2 \exp(-\lambda_2 t) + Y_3 \exp(-\lambda_3 t) \quad \text{Equation (4)}$$

where  $C(t)$  is the cefixime concentration at time  $t$ ;  $Y_1$ ,  $Y_2$  and  $Y_3$  the extrapolated value to time 0 of the first, second and third phases of cefixime concentration disposition and  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$  are the slopes of first, second and third phases of disposition, respectively.

From these primary parameters the classical parameters were calculated and reported in table 2. The total clearance was estimated to  $0.19 \pm 0.12$  l/h/kg. The steady state volume of distribution ( $V_{ss}$ ) was  $1.27 \pm 1.2$  l/kg. The terminal half life ( $t_{1/2\lambda_3}$ ) was  $4.6 \pm 22.48$  h and MRT was  $8.31 \pm 7.50$  h. From statistical moment approach the total clearance was estimated at  $0.18 \pm 0.12$  l/h/kg,  $V_{ss}$  at  $0.40 \pm 0.24$  l/kg and  $t_{1/2\lambda_3}$  at  $4.0 \pm 6.75$  h. No statistically differences were observed after comparison of parameters obtained by compartmental analysis or by statistical moment approach. However the variability is less high when parameters are estimated by statistical moment approaches.

After oral administration two of six animals had the plasma concentration vs time best described by two exponential equations with lag-time (eq. 5). For the rest of animals concentration profiles were described by tri-exponential equation with lag time (eq. 6).

$$C(t) = \frac{FDk_a}{V_d(k_a - \lambda_1)} \left[ \exp(-\lambda_1(t - t_{lag})) - \exp(-k_a(t - t_{lag})) \right] \quad \text{Equation (5)}$$

$$C(t) = Y_1 \exp(-\lambda_1(t - t_{lag})) + Y_2 \exp(-\lambda_2(t - t_{lag})) - \left[ (Y_1 + Y_2) \exp(-k_a(t - t_{lag})) \right] \quad \text{Equation (6)}$$

From compartmental analysis the maximum concentration ( $C_{max}$ ) was  $1.17 \pm 0.67$  mg/l at occurring time of  $1.66 \pm 0.63$  h. These values were no significantly different from data obtained by statistical moment approach i.e.  $1.49 \pm 0.80$  mg/l and  $1.69 \pm 0.53$  h respectively. The absorption half-life and the terminal half-life were  $0.52 \pm 0.81$  h and  $2.21$

$\pm 1.96$  h, respectively. From statistical moment approach, terminal half-life was not different ( $2.34 \pm 3.10$  h) when it is compared to the terminal half-life obtained from compartmental analysis. No statistical difference was observed between terminal half-life from *i.v.* administration and terminal half-life from *p.o.* administration. MRT was estimated  $4.27 \pm 1.38$  h and MAT was  $1.42 \pm 2.70$  h. The absolute bioavailability was  $22 \pm 10$  % from compartmental analysis and  $25 \pm 12$  % from SMA and was not significantly different. Pharmacokinetic parameters obtained from statistical moment approach in rats and humans that received by *i.v.* route and by oral administration a dose of 200 mg of cefixime (table 3) [18] have been compared. Statistical differences were clearly observed for AUC and volume of distribution but not for elimination half-life, clearance, and bioavailability between rats and humans.

### 3.2. Antibiotic susceptibility and time-kill curves

The susceptibility patterns of the 10 *Enterobacteriaceae* including one cefixime-susceptible ( $MIC_{\text{cefixime}} = 0.125$  mg/l) and nine cefixime-resistant stains ( $MIC_{\text{cefixime}} = 4-8$  mg/l) were reported in table 1. With *S. enterica* Virchow and *E. coli* J5 (p3464b) transconjugant, the plotting of killing curves shows a slow killing rate, and cefixime must be in contact with the bacteria at a concentration always 1024 mg/l with regrowth at 8 h and 16 mg/l to exert a bactericidal effect, respectively. Cefixime behave like a time dependant antibiotic (figure 2a, 2c and 2d). For *E. coli* J5, although the concentration-effect relationship of cefixime is relatively concentration “independent”, there is a range of four à five times the MIC where the effect increases, while at slightly lower concentrations, some effect is still observed (figure 2b). The bactericidal effect was obtained from 1 mg/l with a decreased of 7  $\log_{10}$  at 24 h.

### 3.3. PK/PD target

Single administration of 4 mg/kg BW of cefixime *p.o.* yielded a  $T > MIC$  of 48.41 % for the susceptible strain *E. coli* J5. With a dosing regimen of 4 mg/kg BW of cefixime every 8, 10 or 12 h,  $T > MIC$  prediction attained 85.91, 87.50, 85.54 %. For the resistant

strain *S. enterica* Virchow and *E. coli* J5 (p3464b) transconjugant, the systemic concentration was always below the MIC.

#### 4. Discussion

Cefixime was a broad-spectrum oral cephalosporin usually used in human medicine. In order to extrapolate cefixime efficacy in human, the pharmacokinetic cefixime obtained in rat was carefully compared with pharmacokinetic data of human published by Duverne *et al.* [18] for oral medication at 200 mg of cefixime i.e. 2.70 mg/kg BW. After oral or intravenous administration, the most important pharmacokinetic parameters accounted for by difference species are the bioavailability, systemic clearance and the protein binding. According to the literature, the binding protein was unchanged in human (63 %) and rat model (61 %) [19]. With regard to cefixime parameters, our results are comparable to those obtained in human by other authors, regardless of the oral route at therapeutic dose. In rat, cefixime is low absorbed with a bioavailability of  $25.4 \pm 12.6$  % in accordance with the cefixime absorption in human ( $31.5 \pm 6.3$  %) [18]. The peak of concentration observed ( $1.5 \pm 0.8$  mg/l) was also equivalent with those observed in human ( $2.5 \pm 0.4$  mg/l). In human medicine, cefixime was considered as an effective orally active cephalosporin with a relatively long elimination half-life permitting a simplified treatment regimen. In the present experiment, the plasma half-life calculated was about 4 h (versus 3.3 h in human medicine) but was higher than that previously after a 100 mg/kg oral administration in rat (2.3 h) [19]. After *i.v.* injection, the mean values of drug clearance calculated was slightly higher in rat than systemic clearance in human ( $0.18 \pm 0.12$  versus  $0.05 \pm 0.01$  l/h.kg) even so the statistical analyses permit to conclude to the significant equivalence. Nevertheless, the systemic exposure measured by the AUC was 60 % lower for cefixime in rat than those reported in human. This result may be explained by the volume of distribution eight time superior in rat compared in human. An other reason may be the high excretion of cefixime in the bile of human (5 % of the dose) and rat (0.23 % of the dose) as previously described [19,20]. From the bacterial time-kill curves in experiments, for all strains, it can be seen that the rate of bacterial killing did not increase much as the antibiotic concentrations increased. These findings are consistent with the statement that  $\beta$ -lactam reach the saturation killing rate at low multiples of the MIC usually around four to five times the

MIC. Concentrations above these values do not kill the organisms any faster or more extensively. Thus, the extent of killing in this pattern of bactericidal activity is largely dependent on the time of exposure [21,22]. However, a disparity in bactericidal effect was observed for *S. enterica* Virchow (> 1024 mg/l) and *E. coli* J5 (p3464b) transconjugant (16 mg/l) strains although the MIC of cefixime and the resistance gene were identical in both strains.

One aim of these analyses was to examine the achieving PK-PD targets associated with cefixime agents against cefixime-susceptible *E. coli* J5 and *E. coli* transconjugants acquiring the ESBL resistance gene by conjugal transfer. As the result clearly demonstrates, the mean of time above MIC exceed at least 40% of the 24 h dosing period for susceptible *E. coli* strain with all regimens tested. Furthermore, all regimen including conventional regimen provided any % T>CMIC for resistant strains for which the MIC was 4 or 8 mg/l. Indeed, plasma concentrations of cefixime are below the MIC for more 50 % of the dosing interval. For many oral cephalosporins such as cefixime, peak plasma concentration following a 200 mg dose is approximately 2.0 mg/l, so the low drug available impacts on interaction with the organism, especially if the organism has relatively higher MIC values (4 or 8 mg/l). In accordance with these findings, Auckenthaler *et al.* shown that the time that plasma concentrations of cefixime and cefaclor exceed MIC<sub>90</sub> for penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* (MIC<sub>90</sub> = 1 mg/l) occurred 48 and 49 % whereas T>MIC<sub>90</sub> varied from 0 to 48 % for penicillin-intermediate strains of *S. pneumoniae*, respectively [23]. It is likely therefore that, under the assumption of this model, these cephalosporins would be clinically ineffective with regard to the resistant or intermediary strain in question. In this same context, Owens *et al.* described also that T>MIC did not predict the duration of plasma bactericidal titers for cefixime against *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* which the MIC was superior to 0.5 mg/l [24]. On the contrary, Andes *et al.* studied the impact of ESBL production in *E. coli* and *K. pneumoniae* on the activity of oral cephalosporin cefepime in the neutropenic murine-thigh model of infection. The observation was that ESBL production in *E. coli* and *K. pneumoniae* strains had no impact upon the T>MIC necessary for *in vivo* cefepime efficacy [25]. In time-kill experiment, Bedenic *et al.* [26] concluded also that older cephalosporin may be considered efficient for the therapy of infections caused by *E. coli* producing broad-spectrum  $\beta$ -lactamase such as TEM-1, TEM-2 or SHV-1.

In conclusion, the increasing prevalence of ESBL-producing strains is of clinical concern. Our analyses demonstrate that ESBL-producing *S. enterica* Virchow and *E. coli* have a MIC for cefixime above the peak plasma concentration of cefixime. ESBL production in and of itself could be predictive of efficacy and cefixime could appear to be less reliable at least against the strains producing ESBL. In all case, the choice of cefixime in community or hospital acquired infection should seem to appropriate for the treatment of infectious due to susceptible strain. The systematic laboratory identification could be recommended in order to increase the therapeutic success rate.

**Acknowledgments**

The authors would like to thank M. Gicquel and A. Perrin-Guyomard from AFSSA-Fougeres for their help.

**Fundings**

This work was supported by internal and Brittany region funding.

**Transparency declaration**

None to declare.

**Table 1.** Origin of bacteria strains tested and respective MIC<sub>cefixime</sub> values

Bacteria species (number of strains)	Origin	MIC <sub>cefixime</sub> (mg/l)	Reference
<i>Salmonella enterica</i> Virchow 3464b (n = 1)	poultry environment	8	[9]
<i>Escherichia coli</i> J5 (n = 1)	Laboratory	0.125	[9]
<i>E. coli</i> J5 (p3464b) transconjugant (n = 4)	<i>in vivo</i> transfer without cefixime	4 – 8	our laboratory
<i>E. coli</i> J5 (p3464b) transconjugant (n = 4)	<i>in vivo</i> transfer with cefixime	4 – 8	our laboratory

**Table 2.** Mean Pharmacokinetic parameters of cefixime obtained in rats ( $n = 6$ ) after administration of cefixime by intravenous (*i.v.*) and *per os* (*p.o.*) administrations.

Parameter <sup>a</sup>	Unit	<i>i.v.</i>		<i>p.o.</i>	
		Compartmental analysis	Statistical approach	Compartmental analysis	Statistical approach
$T_{lag}$	h	-	-	0.22 ± 0.23	-
$T_{max}$	h	-	-	1.66 ± 0.63	1.69 ± 0.53
$C_{max}$	mg/l	-	-	1.17 ± 0.67	1.49 ± 0.80
$AUC_{0-inf}$	mg.h/l	26.8 ± 12.33	27.5 ± 12.4 <sup>b</sup>	6.52 ± 4.55	7.32 ± 5.60
$AUC_{extr}$	%	-	3.22 ± 3.27	-	3.96 ± 5.61
$t_{1/2}$ absorption	h	-	-	0.52 ± 0.81	-
$t_{1/2 \lambda_3}$	h	4.6 ± 22.48	4.0 ± 6.75	2.21 ± 1.96	2.34 ± 3.10
$Cl_T$	l/h.kg	0.19 ± 0.12	0.18 ± 0.12	-	-
$V_{ss}$	l/kg	1.27 ± 1.2	0.40 ± 0.24	-	-
$V_{\beta}$	l/kg	3.88 ± 3.89	1.77 ± 1.16	-	-
$MRT_{0-inf}$	h	8.31 ± 7.5	2.85 ± 2.1	-	4.27 ± 1.38
$MAT_{0-inf}$	h	-	-	-	1.42 ± 2.70
$F$	%	-	-	22.8 ± 10.3	25.4 ± 12.6

$T_{lag}$ : lag time for absorption;  $T_{max}$ , time to maximum concentration of cefixime in plasma;  $C_{max}$ , peak concentration of cefixime in plasma;  $AUC_{0-inf}$ : area under the plasma concentration-time curve from 0 to infinity;  $AUC_{extr}$ : area extrapolated between  $C_{last}$  and infinity;  $t_{1/2}$  absorption: half-life of absorption ;  $t_{1/2 \lambda_3}$ : half-life of the terminal phase;  $Cl_T$ : total plasma clearance;  $V_{ss}$ : steady state volume of distribution;  $V_{\beta}$  : volume of distribution for the terminal phase;  $MRT_{0-inf}$ : Mean resident time between 0 and infinity;  $MAT_{0-inf}$ : Mean absorption time between 0 and infinity;  $F$ : absolute bioavailability.

**Table 3.** Comparison of pharmacokinetic parameters after *i.v.* administration or oral administration of cefixime in rat and human. Parameters are determined by statistical moment approach.

Parameter <sup>a</sup>	Unit	i.v.		p.o.	
		Rat (4 mg/kg) <sup>c</sup>	Human (200 mg) <sup>d</sup>	Rat (4 mg/kg) <sup>c</sup>	Human (200 mg) <sup>d</sup>
$C_{max}$	mg/l	-	-	1.5 ± 0.8	2.5 ± 0.4
$T_{max}$	H	-	-	1.7 ± 0.5	3.7 ± 0.7
AUC <sub>0-inf</sub>	mg.h/l	27.5 ± 12.4 <sup>b</sup>	53.5 ± 8.0	7.3 ± 5.6	18.2 ± 3.8
$t_{1/2\lambda_3}$	H	4.0 ± 6.75	3.3 ± 0.4	2.3 ± 3.1	3.3 ± 0.4
Cl <sub>T</sub>	l/h.kg	0.18 ± 0.12	0.05 ± 0.01	-	-
V <sub>β</sub>	l/kg	1.77 ± 1.16	0.22 ± 0.03	-	-
F	%	-	-	25.4 ± 12.6-	31.5 ± 6.3

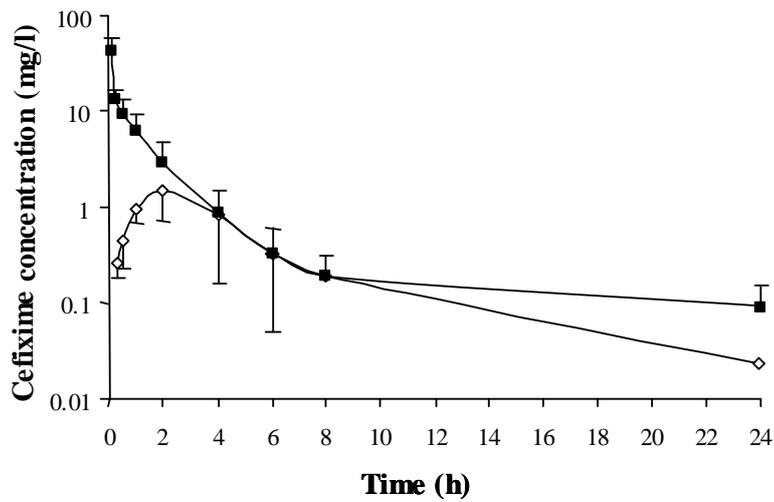
<sup>a</sup>  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , AUC<sub>0-inf</sub>,  $t_{1/2\lambda_3}$ , Cl<sub>T</sub>, F, V<sub>β</sub> are defined in table 2.

<sup>b</sup> values are means ± SD.

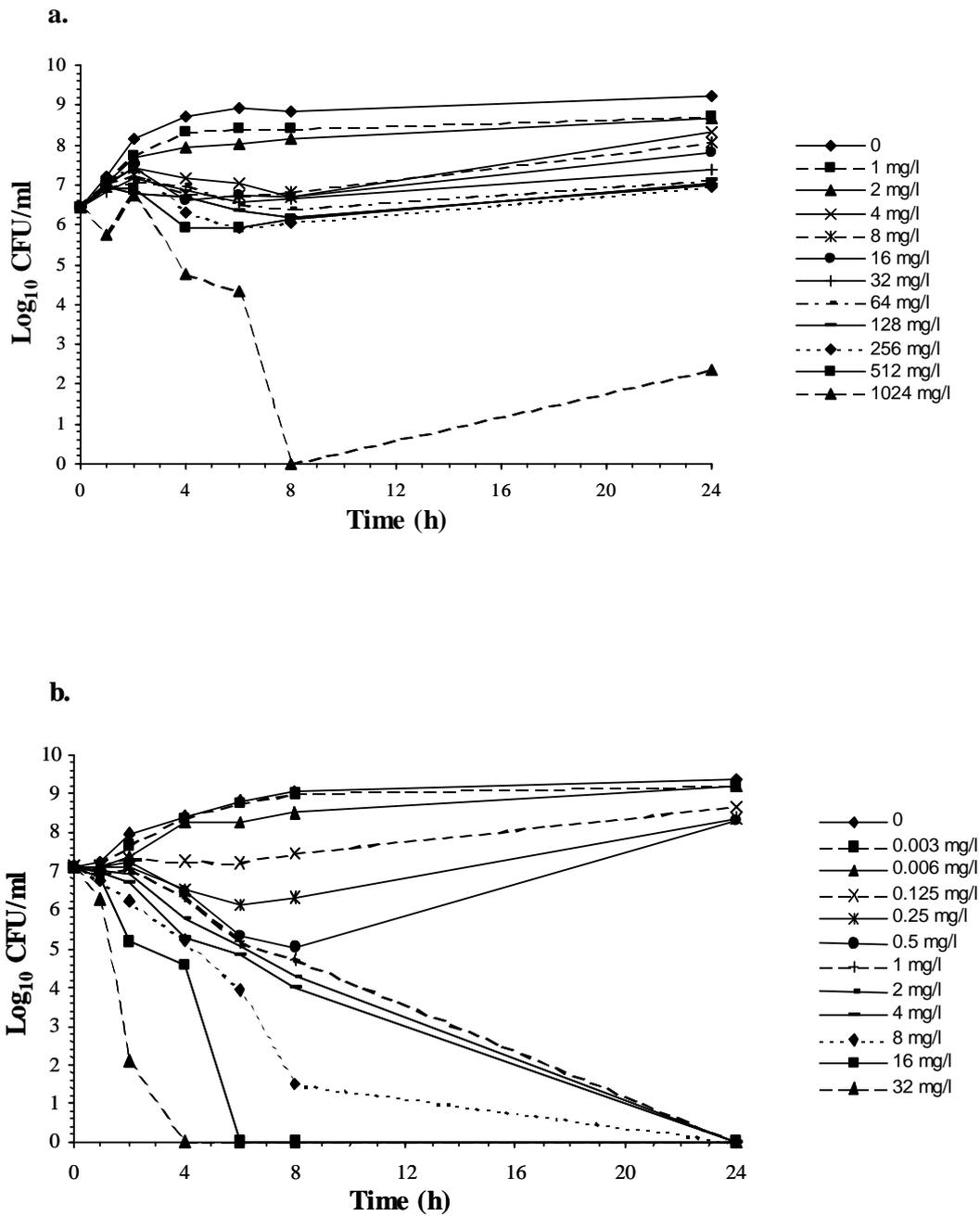
<sup>c</sup> cefixime dose noted in parentheses.

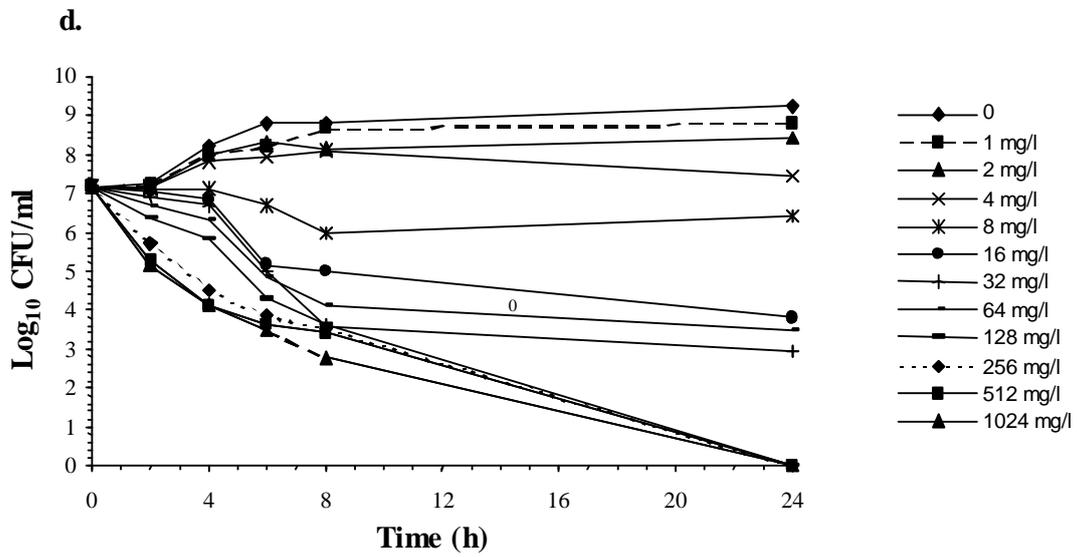
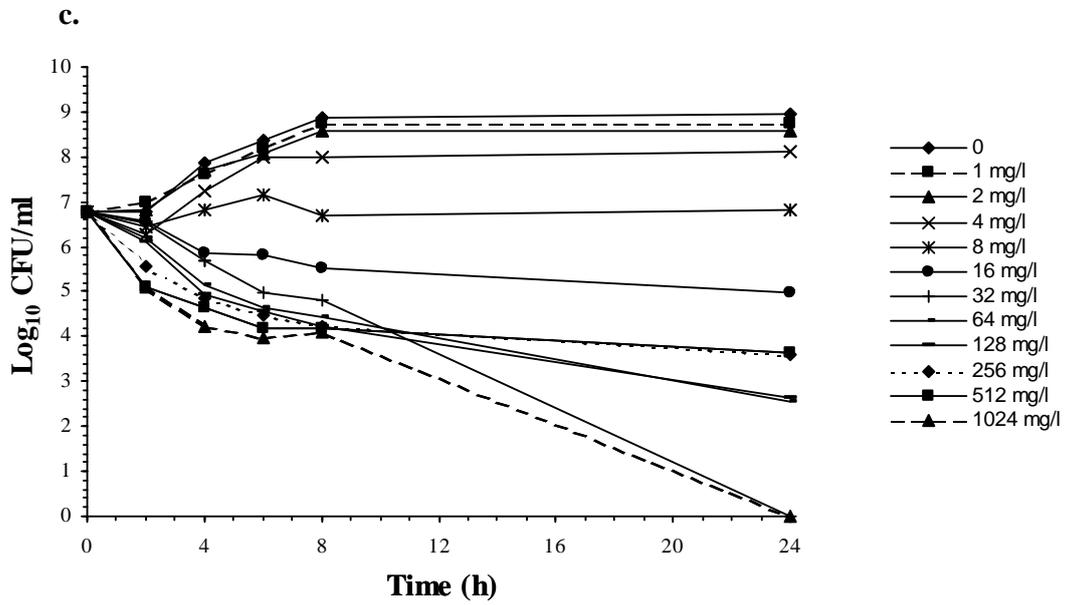
<sup>d</sup> pharmacokinetic parameters of cefixime obtained from Duverne *et al.* report [18]. 200 mg/kg corresponding at a dose of 2.70 mg/kg for a mean bodyweight of 74 kg.

**Figure 1.** Semi-logarithmic plot of cefixime plasma concentration profile after single administration of cefixime at 4 mg/kg by intravenous route (black square) and after single oral administration of Oroken® (cefixime speciality) at dose of 4 mg/kg (white square). Each point represents the arithmetic mean  $\pm$  SD ( $n=6$ ). The LOQ was determined at 20 ng/l.



**Figure 2.** Time-kill curves of cefixime against (a) cefixime-resistant donor *S. enterica* Virchow ( $MIC_{\text{cefixime}} = 8 \text{ mg/l}$ ), (b) cefixime-susceptible recipient *E. coli* J5 ( $MIC_{\text{cefixime}} = 0.125 \text{ mg/l}$ ), (c) one clone representative of cefixime-resistant *E. coli* J5 (p3464b) ( $MIC_{\text{cefixime}} = 8 \text{ mg/l}$ ) isolated from feces of rat treated at the therapeutic dose of cefixime and (d) one clone representative of cefixime-resistant *E. coli* J5 (p3464b) ( $MIC_{\text{cefixime}} = 8 \text{ mg/l}$ ) isolated from control group feces.





## References

- [1] R. Canton and T.M. Coque The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic, *Microbiol* 9 2006; 466-475.
- [2] R. Canton, A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero and T.M. Coque Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$  -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1 2008; 144-153.
- [3] D.M. Livermore, R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G.M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T.M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel and N. Woodford CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 2007;165-174.
- [4] L.H. Su, C.H. Chiu, C. Chu, M.H. Wang, J.H. Chia and T.L. Wu In vivo acquisition of ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serotype anatum, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 2003; 563-567.
- [5] M. Negri, M. Lipsitch, J. Blazquez, B. Levin and F. Baquero Concentration-Dependent Selection of Small Phenotypic Differences in TEM  $\beta$ -Lactamase-Mediated Antibiotic Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 2000; 2485-2491.
- [6] I. Odenholt-Tornqvist, E. Lowdin and O. Cars Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of  $\beta$  -lactam antibiotics in vitro., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35 1991; 1834-1839.
- [7] W. Craig Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of  $\beta$ -lactams, glycopeptides, and linezolid, *Infect Dis Clin N Am* 17 2003; 479-501.
- [8] W. Craig Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins., *Diagn Microbiol Infect Dis* 22 1995; 89-96.
- [9] F.X. Weill, R. Lailier, K. Praud, A. Kerouanton, L. Fabre, A. Brisabois, P.A. Grimont and A. Cloeckaert Emergence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France, *J Clin Microbiol* 42 2004; 5767-5773.
- [10] CLSI Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; Approved Guideline-Third Edition, M37-A3Vol. 0 No. 0 Replaces M37-A2Vol. 22 No. 7 2007.
- [11] R.D. Faulkner, P. Fernandez, G. Lawrence, L.L. Sia, A.J. Falkowski, A.I. Weiss, A. Yacobi and B.M. Silber Absolute bioavailability of cefixime in man, *Journal of Clinical Pharmacology* 28 1988; 700-706.
- [12] F. Meng, X. Chen, Y. Zeng and D. Zhong Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of cefixime in human plasma: application to a pharmacokinetic study, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 819 2005; 277-282.
- [13] K. Yamaoka, T. Nakagawa and T. Uno Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations, *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 6 1978; 165-175.
- [14] M. Gibaldi and D. Perrier *Pharmacokinetics*, Informa Healthcare, 1982.
- [15] W. Ritschel *Basic pharmacokinetics*, Drug Intelligence Publications, Hamilton, 1992.
- [16] J. Mouton, N. Punt and A. Vinks Concentration-Effect Relationship of Ceftazidime Explains Why the Time above the MIC Is 40 Percent for a Static Effect In Vivo?, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 2007; 3449-3451.

- [17] F. Lam, C. Hung and D. Perrier Estimation of variance for harmonic mean half-lives, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74 1985.
- [18] C. Duverne, A. Bouten, A. Deslandes, J. Westphal, J. Trouvin, R. Farinotti and C. Carbon Modification of cefixime bioavailability by nifedipine in humans: involvement of the dipeptide carrier system., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 1992; 2462-2467.
- [19] H. Sakamoto, T. Hirose and Y. Mine Pharmacokinetic of FK037 in rats and dogs, *J Antibiot (Tokyo)* 38 1985; 496-504.
- [20] J. Westphal, F. Jehl, M. Schloegel, H. Monteil and J. Brogard Biliary excretion of cefixime: assessment in patients provided with T-tube drainage., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 1993; 1488-1491.
- [21] W. Craig Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men, *Clinical Infectious Diseases* 26 (1998) 1-12.
- [22] W. Craig and S. Ebert Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review., *Scand J Infect Dis Suppl* 74 1990; 63-70.
- [23] R. Auckenthaler Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral  $\beta$ -lactam antibiotics as a two-dimensional approach to their efficacy., *J Antimicrob Chemother* 50 2002;13.
- [24] R. Owens, P. Tessier, C. Nightingale, P. Ambrose, R. Quintiliani and D. Nicolau Pharmacodynamics of ceftriaxone and cefixime against community-acquired respiratory tract pathogens, *J Antimicrob Agents* 17 2001; 483-489.
- [25] D. Andes and W. Craig Impact of ESBL production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* on the activity of cefepime in the neutropenic murine-thigh model of infection, 41 st Conf. Antimicrob Agents Chemother A-1099 2001.
- [26] B. Bedenic, J. Vranes, S. Suto and Z. Zagar Bactericidal activity of oral  $\beta$ -lactam antibiotics in plasma and urine versus isogenic *Escherichia coli* strains producing broad-and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, *Int J Antimicrob Agents* 25 2005; 479-487.

*DISCUSSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES*

Depuis presque 20 ans, les microbiologistes ont tenté d'alerter la communauté médicale sur l'émergence de la résistance aux antibiotiques et le risque qu'elle représentait. Cependant, sans doute peu crédibles par leur tout *in vitro in veritas*, et pas assez « evidence-based medicine », il a fallu que le cri d'alerte contre l'utilisation anarchique des antibiotiques et leurs conséquences soit poussé par les autorités. Longtemps confinée aux hôpitaux, la dissémination de la résistance aux antibiotiques atteint désormais les bactéries responsables d'infections communautaires. Les études épidémiologiques ou moléculaires, de plus en plus nombreuses, rapportent également l'existence d'un potentiel transfert de gène de résistance, notamment entre l'animal et l'homme. Concernant les BLSE, la contamination *via* l'alimentation a largement été mise en cause, néanmoins, peu de souches productrices de BLSE d'origine animale ont été signalées, tandis que ces enzymes sont fréquemment détectées dans les isolats humains. Il n'y a pas de lien prouvé entre le portage animal et les infections humaines.

La mise en évidence du transfert de gène dans des conditions *in vivo* est aujourd'hui peu documentée. La complexité du phénomène réside essentiellement dans la capacité à distinguer les flux de gènes du flux bactérien et dissocier les écosystèmes et les mécanismes de résistance d'origine humaine et d'origine animale. De plus, il faut souligner que l'existence de ces flux de gènes, quel qu'en soient les modalités (*via* l'environnement, *via* la transmission directe ou *via* l'alimentation), peut être influencée par l'avantage écologique des souches résistantes du à l'exposition aux antibiotiques. Ainsi, compte tenu du manque de données dans la littérature concernant le potentiel transfert de gènes de résistances *in vivo* entre des bactéries d'origine animale et les bactéries d'origine humaine, l'objectif de cette thèse était d'évaluer 1) le transfert du gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> entre une souche d'origine animale, *Salmonella enterica* Virchow, et les entérobactéries de la flore humaine 2) l'impact d'un traitement au céfixime sur le transfert du gène et 3) les paramètres PK-PD du céfixime vis-à-vis de souches productrices de BLSE.

## INTERET DU MODELE EXPERIMENTAL

Parmi les bactéries zoonotiques, *Salmonella spp.* représente la cause la plus fréquente d'infections bactériennes d'origine alimentaire responsable d'environ 30 000 à

40 000 cas annuels confirmés selon l'Institut de Veille Sanitaire (12). Il s'agit de bactéries dont la colonisation asymptomatique est très répandue chez certains animaux d'élevage, alors que chez l'homme la présence de la bactérie est quasi systématiquement symptomatique. La transmission à l'homme se fait essentiellement par la consommation d'aliments contaminés comme la charcuterie, les viandes, les œufs et produits dérivés, les produits laitiers et les poissons. Chaque année, le Centre National de Référence reçoit environ 16 000 isollements ou signalements de salmonelles non-typhoïdes. En 2004, une alerte a été signalée en France suite à l'identification de souches de *Salmonella enterica* Virchow résistantes aux C3G, isolées de volailles et d'environnement d'élevage. La caractérisation de ces souches montra que le gène de résistance incriminé, le gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, était un gène porté par un plasmide transférable *in vitro* à *E. coli* (235).

Dans l'objectif d'évaluer l'efficacité du transfert de ce gène de résistance *in vivo*, deux modèles de rongeurs ont été utilisés : les rats dixéniques (modèle simple) et les rats à flore intestinale humaine (modèle complexe). Les **rats axéniques** sont des animaux dépourvus de germes, élevés depuis leur naissance dans un environnement stérile. Lorsque les rats axéniques sont inoculés avec une ou plusieurs souches ils deviennent des rats **gnotoxéniques** ou **gnotobiotiques** (du latin gnotos = connu). Dans un contexte d'échanges de gènes, le modèle de **rat dixénique** (deux souches) à l'avantage de favoriser la colonisation et l'implantation des bactéries cibles (donneur et récepteur) du fait de l'absence de résistance à la colonisation (flore de barrière). Il permet ainsi d'amplifier le phénomène de transfert ainsi que l'effet de différents stress comme l'administration d'antibiotiques.

**Les rats associés à une flore humaine** sont des rats axéniques inoculés par une flore fécale humaine. L'utilisation d'animaux conventionnels peut également être envisagée. Néanmoins, outre la différence de composition de la flore microbienne entre l'animal et l'homme (ex : absence d'*E. coli* dans le tractus digestif des rongeurs), les animaux conventionnels comme le porc, sont souvent naturellement porteurs d'entérobactéries résistantes. De ce fait, l'évaluation du transfert de gènes de résistance en lui-même serait difficile à apprécier. De plus, le modèle expérimental proposé a déjà montré son efficacité dans l'évaluation de la sécurité microbiologique des antibiotiques, comme la ciprofloxacine et la tétracycline lors d'un partenariat entre le laboratoire et la Food and Drug Administration (174, 175).

Les C3G sont des antibiotiques à large spectre dont la multiplicité des molécules a nécessité de prendre en considération un certain nombre de critères pharmacologiques et bactériologiques pour le choix du principe actif de l'étude. Une étude bibliographique a permis dans un premier temps de sélectionner des molécules d'intérêt selon leur utilisation en médecine humaine, leur voie d'administration, leur métabolisation, leur voie d'élimination, leur posologie et leur commercialisation. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux C3G utilisées en médecine humaine dont la voie d'administration préconisée est la voie orale. Les deux principales molécules ciblées furent le cefixime et le cefpodoxime proxétile. Bien que le cefpodoxime proxétile présentait un intérêt particulier quant à son activité bactéricide vis-à-vis des souches *S. enterica* Virchow et *E. coli* J5, certaines caractéristiques métaboliques de la molécule se sont révélées limitantes. En effet, le cefpodoxime est une prodrogue, ce qui signifie que la molécule doit subir une bio-transformation pour que s'exerce son activité pharmacologique. Ainsi, après administration orale, le cefpodoxime proxétile est absorbé en milieu intestinal et rapidement hydrolysé par des estérases non-spécifiques, en cefpodoxime, un antibiotique bactéricide. De ce fait, de part l'indisponibilité du principe actif dans le commerce et la complexité de la mise en place d'une production du cefpodoxime au sein du laboratoire, la C3G retenue fut le **céfixime**.

## **LE TRANSFERT DE GENES ENTRE *SALMONELLA ENTERICA* VIRCHOW ET *ESCHERICHIA COLI* IN VITRO VERSUS IN VIVO CHEZ DES RATS AXENIQUES**

*In vitro*, le transfert du gène de résistance *bla*<sub>CTX-M-9</sub> entre *S. enterica* Virchow et *E. coli* J5, a été confirmé avec une fréquence de transfert de  $\sim 10^{-8}$  transconjugants / donneurs (Article 1). D'après les données de la littérature, ce taux de transfert est relativement faible mais peut être expliqué par le fait que le transfert inter-espèce est souvent moins efficace que le transfert intra-espèce (124, 129, 151). Dans le modèle de rat axénique, la fréquence de transfert était de  $\sim 10^{-5}$  transconjugants / donneurs. Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude récente de Feld *et al*, où le taux de transfert du plasmide de *Lactococcus plantarum* à *Enterococcus faecalis* était 3 à 4 log<sub>10</sub> plus élevé dans le modèle gnotobiotique que *in vitro* (91). La dynamique exercée par les mouvements péristaltiques

du tractus gastro-intestinal *in vivo*, permettrait un mélange constant et un contact étroit entre souches donneuses et réceptrices favorisant des taux de transfert plus élevés qu'*in vitro*. De plus, *in vitro*, la résistance à la streptomycine, la tétracycline, triméthoprime et le triméthoprime / sulphamethoxazole, est co-transférée chez les transconjugants. Etonnamment, ce co-transfert pas pas été détecté chez les transconjugants isolés lors de l'étude *in vivo*. Ces résultats ont déjà été observés par Novais *et al*, lors de la caractérisation de souches portant un intégron In60 contenant le gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (167). Les hypothèses avancées ont été l'inactivation des gènes, la présence de gènes silencieux ou encore le transfert non achevé du plasmide, mais sans confirmation.

Ces premiers travaux démontrent que le taux de transfert est sous-estimé *in vitro* en comparaison au taux mesuré *in vivo*. Cependant, il est difficile de distinguer *in vivo*, le flux de gène de la multiplication des clones. D'après nos résultats, le temps de génération *in vitro* de *Salmonella* et *E. coli* était approximativement de 20 minutes tandis que le temps de doublement des transconjugants était de 38 min. En supposant que ce temps de génération soit le même dans le tractus digestif des rats, le taux de transfert plus élevé *in vivo* serait effectivement dû à l'augmentation des échanges de gènes de résistance dans ces conditions comme il est possible de l'observer dans un chemostat (138).

## LE TRANSFERT DE GENES DANS LA FLORE HUMAINE

La microflore intestinale chez l'homme et l'animal inhibe la croissance de micro-organismes potentiellement pathogènes par un mécanisme de défense appelé « résistance à la colonisation ». Afin d'évaluer le transfert du gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> dans une flore complexe, *S. enterica* Virchow a été inoculée chez des rats associés à une flore fécale humaine (Article 2). Dans nos conditions expérimentales, la diffusion du gène n'a pas été détectée chez les entérobactéries de la flore humaine. Ce résultat a également été rapporté par d'autres auteurs. Bourgeois-Nicolaos *et al.* montrèrent par exemple que le transfert du gène *vanA* de souches d'*Enterococcus faecium* à *E. faecalis* et à *E. faecium* dans un modèle de souris-AFH était indétectable (34). L'auteur supposait que la colonisation de la souche réceptrice était trop faible (6 log<sub>10</sub> UFC/g de fécès d'entérocoques dont 10 % de *E. faecium* et 90 % de *E. faecalis*) pour permettre la détection du transfert de gène. Dans nos conditions, le niveau de

population des entérobactéries est approximativement de  $7 \log_{10}$  UFC/ g de fécès, ce qui, d'après les résultats observés dans le modèle de rat dixénique, devrait être suffisant pour observer un transfert de gène. Néanmoins, en présence d'une flore de barrière, les bactéries exogènes comme *S. enterica* Virchow, colonisent difficilement le tractus digestif du fait de la compétition avec la flore endogène hautement adaptée (73, 87). Ainsi, la souche donneuse inhibée et/ou excrétée avec le contenu fécal serait en quantité insuffisante pour permettre de détecter les transconjugants ( $< 2 \log_{10}$  UFC/g de fécès) (138). Outre la résistance à la colonisation, la flore est capable d'excréter des métabolites inhibiteurs du transfert de gène ou de produire des substances inhibitrices comme les bactériocines ou autres molécules impliquées dans les phénomènes de « quorum sensing ». En effet, de récents travaux ont montré que *Bifidobacterium* pouvait inhiber le transfert du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> par production de métabolites thermostables (159).

Dans le tractus gastro-intestinal, la surface de l'épithélium est recouverte par une couche protectrice de mucus. Elle constitue également une barrière physique entre le tissu-sous-jacent et les micro-organismes et leurs toxines. Ainsi, d'après Licht *et al.*, le transfert de plasmides se produirait majoritairement dans le mucus de la paroi intestinale (138). Comme dans les biofilms, le transfert aurait lieu lors du contact initial entre les souches donneuses et réceptrices dans les couches supérieures du mucus mais serait limité avec les souches réceptrices des couches inférieures de mucus (138).

L'ajout d'une souche réceptrice exogène en plus de la souche donneuse conduit à une apparition rapide de transconjugants dans les fécès de rats-AFH. Dans de telles conditions, le taux de transfert est élevé mais transitoire. En effet, les transconjugants ne sont plus détectés deux jours après leur apparition. Chez des volontaires sains, Lester *et al.* (21), ont observé qu'en l'absence de pression de sélection, le transfert du gène de résistance *vanA* entre une souche de *E. faecium* d'origine animale et les souches d'*E. faecium* endogènes de la flore humaine se produisait chez trois individus sur six. Dans leurs travaux, les transconjugants n'étaient plus observés deux à quatre jours après l'inoculation de la souche donneuse. Ces résultats suggèrent que la composition individuelle de la flore intestinale, la présence de souches potentiellement réceptrices ou encore le spectre d'hôte des éléments génétiques mobile sont autant de facteurs influençant le transfert de gènes. Dans ce contexte, des travaux très récents ont rapporté que la mutation de certains gènes non-essentiels à la bactérie réceptrice tels que les gènes impliqués dans la voie de

biosynthèse du lipopolysaccharide, pouvaient affecter la capacité de conjugaison de la souche (173).

D'après l'électrophorèse en champs pulsé, tous les transconjugants seraient issus de la souche réceptrice *E. coli* J5. Néanmoins, d'après le gel d'électrophorèse, un pulsotype se distingue des autres par la présence d'un fragment de ~ 774 kb au lieu de ~ 677 kb pour les autres pulsotypes. Ce phénomène peut être expliqué par deux évènements : le premier est la conséquence d'une mutation ponctuelle dans le site de restriction de l'enzyme *Bln* I. Dans ce cas, nous devrions observer la perte de deux bandes et l'acquisition d'une bande dont la taille serait égale à la somme des deux bandes perdues soit ~ 774 kb. Or nous ne détectons que la perte du fragment de 677 kb. De ce fait, il s'agirait sans doute d'une insertion d'ADN exogène de ~ 97 kb. Ce phénomène peut effectivement être observé lors de l'intégration d'un élément génétique mobile comme les intégrons. Selon Fernandez *et al.*, le gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> est présent dans un intégron dont les cassettes de gènes ont été récemment caractérisées (92). De ce fait, l'intégration chromosomique de cassettes de gènes de résistance semble plausible. Ces résultats doivent néanmoins être confirmés par Southern blot. L'identification et la quantification de l'intégration dans le génome de bactéries sensibles des intégrons véhiculant des cassettes de gènes de résistance tels que le gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> seraient intéressante à vérifier dans la mesure où la mobilité de ces éléments génétiques mobiles est peu rapporté *in vivo*.

## **IMPACT D'UNE PRESSION DE SELECTION SUR LE TRANSFERT DE GENE, LA SELECTION ET LA PERSISTANCE DE BACTERIES RESISTANTES**

**Chez les rats dixéniques traités au céfixime**, la fréquence de transfert entre *S. enterica* Virchow et *E. coli* J5 est comparable au taux de transfert mesuré dans le groupe témoin (~ 10<sup>-5</sup> transconjugants / donneurs avant le traitement et douze jours après l'arrêt du traitement) (Article 1). Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude montrant que le taux de transfert du plasmide conjugatif contenant le gène *cmv-2* de *S. enterica* Newport à *E. coli* n'était pas augmenté lorsque les animaux étaient traités au ceftiofur (185). Pendant toute la durée du traitement au céfixime, le taux de transfert est très faible voire difficile à mesurer du fait de la diminution importante du niveau de population des transconjugants.

Ceci est corrélé avec une forte concentration de céfixime détectée dans les fécès excédant de 4 fois la CMI de *S. enterica* Virchow et des transconjugants. Il faut noter que la concentration de céfixime mesurée dans les fécès ne reflète pas nécessairement l'activité de l'antibiotique du fait des éventuelles liaisons de l'antibiotique au contenu fécal, le rendant indisponible.

L'une des explications de la diminution prononcée des transconjugants par rapport aux souches donneuses serait le coût biologique exercé par l'acquisition et l'expression de la résistance chez les transconjugants (20). Une autre des explications concernerait l'effet population sur la sensibilité des souches. *In vitro*, la CMI est mesurée à l'aide d'un inoculum ajusté et standardisé alors que, dans le tractus digestif, le niveau des populations bactériennes fluctue et peut affecter la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des C3G (31, 177). A titre d'exemple, lorsque l'inoculum est augmenté de 100 fois, le taux d'entérobactéries sensibles au céfépime est diminué de 98,6 % à 65 % (31).

**Chez les rats à flore humaine**, les taux de transfert du gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> entre *S. enterica* Virchow et les entérobactéries de la flore humaine ou la souche réceptrice *E.coli* J5 ne sont pas modifiés par le traitement au céfixime (Article 2). De même, l'antibiotique ne semble pas favoriser la colonisation des transconjugants dans le tractus digestif des rats traités. *A contrario*, les travaux de Duval-Iflah *et al.*, montraient l'implantation des transconjugants à défaut des souches réceptrices dans le tractus de souris-AFH traitées à l'ampicilline (79). Ces résultats peuvent être expliqués par les facteurs propres à la souche réceptrice comme le pouvoir invasif de la bactérie et l'expression du niveau de la résistance. En effet, l'administration de céfixime favorise la sélection et la persistance de *S. enterica* Virchow dans la flore intestinale humaine. Des études sur la sélection et la persistance de la résistance aux antibiotiques de *Salmonella* spp. ont également indiqué que le traitement antibiotique augmentait la probabilité de colonisation de la souche dans le tube digestif (1, 30-32).

D'un point de vu général, l'émergence de la résistance lors d'un traitement antibiotique semble davantage liée à la sélection et la multiplication des bactéries résistantes plutôt qu'au transfert d'éléments de résistance. Pourtant, certains rapports montrent qu'une concentration d'antibiotique sub-inhibitrice vis-à-vis des souches réceptrices peut favoriser le transfert de gène de résistance. Nous avons effectivement observé ce phénomène lors de

tests de conjugaison *in vitro* (résultats non montrés). *In vivo*, à la suite d'une administration par voie orale ou parentérale, les concentrations en antibiotique varient au cours du temps. La période pendant laquelle les concentrations plasmatiques sont sub-inhibitrices et favorisent le transfert de gène, peuvent délimiter une fenêtre d'induction du transfert. Compte tenu des variations pharmacocinétiques de chaque molécule, la taille des fenêtres d'induction peut être variable au cours du temps mais aussi selon le site d'action. Dans l'optique de décrire ces fenêtres d'induction du transfert de gène, il serait intéressant de définir l'influence d'un traitement sur le transfert de gènes de résistance selon le site d'action (appareil urinaire, poumon, tractus digestif) ou encore selon les modalités d'administration (voie intraveineuse, orale ou intramusculaire).

## EXCRETION D'ANTIBIOTIQUES DANS LES FECES

Chez les rats dixéniques traités au céfixime (4 mg/kg deux fois par jours, pendant 8 jours), la concentration moyenne de céfixime retrouvée dans les fécès est de 37.2 mg/kg de fécès. Chez les rats à flore humaine, le céfixime n'a pas été détecté dans les fécès pendant toute la durée du traitement. Cette absence de détection a été attribuée à une dégradation de l'antibiotique dans les fécès de rats-AFH. Cependant, le céfixime a quand même eu une activité bactéricide puisque le nombre d'entérobactéries a diminué de 2 log<sub>10</sub> UFC/g de fécès pendant la durée du traitement. Ces résultats sont comparables aux travaux de Chachaty *et al.* qui indiquaient que, pendant un traitement au céfixime à 200 mg deux fois par jours pendant 8 jours, le nombre d'entérobactéries diminuaient de 2 log<sub>10</sub> UFC/g chez les individus présentant une activité β-lactamase dans leurs fécès et baissaient de 3 log<sub>10</sub> UFC/g chez les individus sans activité β-lactamase dans leurs fécès (55). Il montra également que chez des individus traités au céfixime, une activité antibiotique était retrouvée dans les fécès de quatre des six volontaires, même en présence de β-lactamases (56). Dans notre étude, une diminution comparable de la population d'entérobactéries a été observée chez les rats traités au céfixime/acide clavulanique. Ce phénomène peut être expliqué par la présence de souches productrices de β-lactamases en aval de la fenêtre d'action du céfixime. Des études préliminaires *in vitro* ont confirmé la présence de β-lactamases dans les fécès. Afin de définir la zone d'inactivation de l'antibiotique, il serait pertinent d'identifier et de quantifier les espèces bactériennes productrices de ces enzymes

tout au long du tractus digestif. Ainsi, le développement d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases actifs dans cette zone d'inhibition pourrait être envisagé.

## POSOLOGIE INADAPTEE

L'efficacité antibactérienne d'un antibiotique est étroitement liée à ses caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. La prise en considération des propriétés PK/PD du trio antibiotique/bactérie/hôte doit permettre de définir une posologie garantissant les meilleures chances d'efficacité, tout en prévenant l'apparition éventuelle d'effets indésirables et/ou de résistance. Néanmoins, des facteurs mécaniques influent sur la sensibilité des bactéries et peuvent modifier la pharmacodynamie (PD) de l'antibiotique comme l'effet inoculum, la présence de biofilm, la croissance lente de bactéries dans certaines conditions particulières ou encore la sensibilité réduite de certains micro-organismes. La situation est d'autant plus complexe que la résistance peut être inhérente à la bactérie ou bien acquise et que la sensibilité de la bactérie peut être modifiée au cours du traitement. Plusieurs travaux ont rapporté l'échec thérapeutique associé au risque de voir se transformer en cours de traitement aux  $\beta$ -lactamines, une souche de bas niveau de résistance en une souche de haut niveau de résistance (212, 170, 194, 223).

D'après nos résultats, ceci s'explique par les doses sub-optimales généralement utilisées lors des traitements empiriques. En effet, en présence des souches de salmonelles et des souches d'*E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M-9, la détermination des paramètres PK/PD du céfixime vis-à-vis de ces souches bactériennes a permis de montrer que la posologie usuelle n'est pas adaptée en présence de telles souches chez des individus. Après l'administration orale de 4 mg/kg de céfixime chez l'homme ou dans un modèle animal (rat), la concentration plasmatique maximale est de  $2.5 \pm 0.4$  ou  $1.5 \pm 0.8$  mg/l, respectivement. La concentration plasmatique prédite du céfixime après une administration de 4 mg/kg toutes les 8 h, 10 h ou 12 h, est de l'ordre 2 mg/l. Pour maintenir la concentration de céfixime au moins égale à 40 % de l'intervalle de temps entre les deux administrations, la posologie de 4 mg/kg une fois par jour serait efficace contre des germes sensibles au céfixime (CMI < 0.5 mg/l). Néanmoins, comme l'exemple précédant nous l'a montré, le risque pour un pathogène, d'acquérir un mécanisme de résistance pendant un traitement est non négligeable. En effet, dans le cas de germes ayant une CMI > 1 mg/l,

suite à l'acquisition d'un plasmide contenant le gène *bla<sub>CTX-M-9</sub>*, l'antibiotique devrait être administré à plus forte dose ou dans le cas d'infections sévères par voie intraveineuse. Dans tous les cas, l'optimisation de la dose apparaît indispensable pour garantir l'efficacité du traitement et la minimisation de la sélection des bactéries résistantes. L'utilisation de combinaisons de  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases semble également être une bonne alternative aux monothérapies. Les indications en médecine humaine des combinaisons de  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases comme l'amoxicilline/acide clavulanique et piperacillin/tazobactam sont restreintes aux infections bactériennes dont il est établi ou probable qu'elles sont produites par des souches productrices de  $\beta$ -lactamases et résistantes à l'amoxicilline. Cette restriction est due aux signalements de cas de réactions allergiques graves, de l'effet inoculum, de l'apparition de mécanismes de résistance aux inhibiteurs et de la présence chez certaines souches de multiples mécanismes de résistance susceptibles de rendre inefficace le traitement(170, 194). Néanmoins, l'utilisation des combinaisons de  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases en clinique est peu documentée ce qui explique qu'elles ne sont pas utilisées en thérapie empirique de premier choix (223). D'après nos résultats, la combinaison cefixime/ acide clavulanique peut-être considérée comme une option efficace, puisque chez des rats à flore humaine la présence de salmonelle n'est plus détectée dès la fin du traitement. Ces études *in vivo* nécessitent néanmoins de plus large expérimentations notamment sur l'efficacité de ces combinaisons en présence de souches multi-résistantes. D'une manière générale, l'avenir des C3G réside dans leur indication pour des infections bactériennes à germes sensibles. L'une des recommandations pour la sauvegarde de ces molécules serait ainsi d'établir un dépistage systématique du germe pathogène mis en cause, et ce, dès les premiers jours des traitements antibiotiques. Dans cette optique, la mise en place de diagnostic rapide, avec en perspective, l'utilisation de nanotechnologies comme les nanosondes identifiant les germes pathogènes et/ou les enzymes de type BLSE, semblerait être une voie de recherche prometteuse.

En conclusion, dans un environnement complexe comme la flore intestinale, le flux de gène est difficilement détectable même en présence d'une pression de sélection. De ce fait, la dissémination du gène de résistance *bla*<sub>CTX-M-9</sub> de *S. enterica* Virchow aux entérobactéries de la flore reste *a priori* un événement rare et nécessite la présence de souches potentiellement « réceptrices » dans l'environnement intestinal. Toutefois, le transfert de gènes de résistance a déjà été prouvé entre une souche d'origine animale et les bactéries de la flore humaine, laissant supposer que l'événement est tout à fait probable. Dans ce contexte, l'évaluation pour l'homme du risque associé à des souches commensales résistantes dans le tractus digestif doit être envisagée, notamment pour leur capacité à diffuser leur gène de résistance aux bactéries pathogènes. Lors d'un traitement antibiotique, la pression de sélection favorise la colonisation et la multiplication du germe résistant dans le tractus digestif augmentant ainsi la probabilité de transfert de gènes de résistance et le risque d'échec thérapeutique. De ce fait, la bonne utilisation des  $\beta$ -lactamines dans une politique globale de prescription raisonnée des antibiotiques demeure indispensable pour que cette famille d'antibiotiques majeure garde toute sa place en thérapeutique.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

1. **Aarestrup, F.** 2005. Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.* **96**:271-281.
2. **Aarestrup, F., H. Wegener, and P. Collignon.** 2008. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **6**:733-750.
3. **Aarestrup F., P. McDermott, G. Kahlmeter.** 2007. Antimicrobial susceptibility testing. Newsletter to the national Reference Laboratories for Antimicrobial Resistance, National Food Institute.
4. **Achard, A., and R. Leclercq.** 2007. Characterization of a small mobilizable transposon, MTnSag1, in *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* **189**:4328-31.
5. **Adams, V., D. Lyras, K. A. Farrow, and J. I. Rood.** 2002. The clostridial mobilisable transposons. *Cell Mol Life Sci* **59**:2033-43.
6. **Alanis, A. J.** 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* **36**:697-705.
7. **Ambler, R.** 1980. The Structure of  $\beta$ -Lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**:321-31.
8. **Andreumont, A., G. Gerbaud, C. Tancrede, and P. Courvalin.** 1985. Plasmid-mediated susceptibility to intestinal microbial antagonisms in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **49**:751-5.
9. **Angulo, F., J. Nunnery, and H. Bair.** 2004. Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* **23**:485-496.
10. **Anonymous.** 2008. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST);. [www.eucast.org](http://www.eucast.org) (16 april 2009 last date accessed).
11. **Anonymous.** 2008. European Food Safety Agency (EFSA) Journal.
12. **Anonymous.** 2006. Morbidité et Mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France, Institut de Veille Sanitaire.
13. **Anonymous.** 2006. Rapport du programme français de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale, AFSSA.
14. **Anonymous.** 2005. Report of monitoring antimicrobial resistance in Denmark (DANMAP).
15. **Anonymous.** 2006. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, AFSSA.
16. **Aubert, G., and A. Carricajo.** 2004. Place du laboratoire dans le choix et le suivi pharmacodynamique de l'antibiothérapie des infections sévères. *Annale Française d'anesthésie et de réanimation.*
17. **Aubry-Damon, H., K. Grenet, P. Sall-Ndiaye, D. Che, E. Cordeiro, M. Bougnoux, E. Rigaud, Y. Strat, V. Lemanissier, and L. Armand-Lefevre.** 2004. Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerg Infect Dis* **10**:873-79.
18. **Avrain, L., C. Vernozy-Rozand, and I. Kempf.** 2004. Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *J Appl Microbiol* **97**:134-40.
19. **Bahl, M. I., S. J. Sorensen, L. H. Hansen, and T. R. Licht.** 2004. Effect of tetracycline on transfer and establishment of the tetracycline-inducible conjugative transposon Tn916 in the guts of gnotobiotic rats. *Appl Environ Microbiol* **70**:758-64.

20. **Bailey, J. E., N. A. Da Silva, S. W. Peretti, J. H. Seo, and F. Srienc.** 1986. Studies of host-plasmid interactions in recombinant microorganisms. *Ann N Y Acad Sci* **469**:194-211.
21. **Barre, J.** 1989. Pharmacokinetic properties of cefixime. *Presse Med* **18**:1578-82.
22. **Barza, M., and K. Travers.** 2002. Excess Infections Due to Antimicrobial Resistance: The HAttributable Fraction". *Clin Infect Dis* **34**:126-30.
23. **Batchelor, M., K. Hopkins, E. Threlfall, F. Clifton-Hadley, A. Stallwood, R. Davies, and E. Liebana.** 2005. bla CTX-M Genes in Clinical *Salmonella* Isolates Recovered from Humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1319-1322.
24. **Bauernfeind, A., S. Schweighart, and H. Grimm.** 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **18**:294-98.
25. **Bayles, K. W.** 2000. The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol* **8**:274-78.
26. **Ben-Ami, R., M. J. Schwaber, S. Navon-Venezia, D. Schwartz, M. Giladi, I. Chmelnitsky, A. Leavitt, and Y. Carmeli.** 2006. Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis* **42**:925-34.
27. **Bennett, P.** 2004. Transposable elements. *The Desk Encyclopedia of Microbiology*:1025-1041.
28. **Bennett, P. M.** 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* **153**.
29. **Bertoni, G., and P. Marsan.** 2005. Safety Risks for Animals Fed Genetic Modified (GM) Plants. *Vet Res Commun* **29**:13-18.
30. **Bertrand, S., F. X. Weill, A. Cloeckart, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemaue, C. Godard, P. Butaye, H. Imberechts, P. A. Grimont, and J. M. Collard.** 2006. Clonal emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J Clin Microbiol* **44**:2897-903.
31. **Betriu, C., S. Salso, A. Sánchez, E. Culebras, M. Gómez, I. Rodríguez-Avial, and J. J. Picazo.** 2006. Comparative *in vitro* activity and the inoculum effect of ertapenem against *Enterobacteriaceae* resistant to extended-spectrum cephalosporins. *J Antimicrob Agents* **28**:1-5.
32. **Blake, D., K. Hillman, D. Fenlon, and J. Low.** 2003. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *J Appl Microbiol* **95**:428-36.
33. **Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1-14.
34. **Bourgeois-Nicolaos, N., C. Moubareck, N. Mangeney, M.-J. Butel, and F. Doucet-Populaire.** 2006. Comparative study of *vanA* gene transfer from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis* and to *Enterococcus faecium* in the intestine of mice. *FEMS Microbiol Lett* **254**:27-33.
35. **Bradford, P. A.** 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **14**:933-51.
36. **Brun-Buisson, C.** 2005. The risk for and approaches to control of nosocomial infections in ICUs: guideline from the SRLF/SFAR task force on nosocomial infections in ICUs. *Réanimation* **14**:463-471.

37. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guedon.** 2002. Conjugative transposons: The tip of the iceberg. *Mol Microbiol* **46**:601-610.
38. **Bush, K.** 1988.  $\beta$ -Lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microbiol Rev* **1**:109-123.
39. **Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211-1233.
40. **Bywater, R., H. Deluyker, E. Deroover, A. de Jong, H. Marion, M. McConville, T. Rowan, T. Shryock, D. Shuster, and V. Thomas.** 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* **54**:744-754.
41. **Bywater, R., P. Silley, and S. Simjee.** 2006. Antimicrobial breakpoints--Definitions and conflicting requirements. *Vet Microbiol* **118**:158-159.
42. **Canton, R., and T. M. Coque.** 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Microbiol* **9**:466-75.
43. **Canton, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 1**:144-53.
44. **Carattoli, A.** 2008. Animal reservoirs for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* **14**:117-123.
45. **Carattoli, A., F. Tosini, W. Giles, M. Rupp, S. Hinrichs, F. Angulo, T. Barrett, and P. Fey.** 2002. Characterization of Plasmids Carrying CMY-2 from Expanded-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Strains Isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:1269-1272.
46. **Caroff, N., E. Espaze, D. Gautreau, H. Richet, and A. Reynaud.** 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J Antimicrob Chemother* **45**:783-8.
47. **Cartelle, M., M. del Mar Tomas, F. Molina, R. Moure, R. Villanueva, and G. Bou.** 2004. High-Level Resistance to Ceftazidime Conferred by a Novel Enzyme, CTX-M-32, Derived from CTX-M-1 through a Single Asp240-Gly Substitution, *Antimicrob Agents Chemother*, **48** : 2308-2313.
48. **Caspi, R., M. Pacek, G. Consiglieri, D. Helinski, A. Toukdarian, and I. Konieczny.** 2001. A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. *The EMBO Journal* **20**:3262-3271.
49. **Castanheira, M., R. Mendes, P. Rhomberg, and R. Jones.** 2008. Rapid Emergence of bla CTX-M Among *Enterobacteriaceae* in US Medical Centers: Molecular Evaluation from the MYSTIC Program (2007). *Microb Drug Resist* **14**:211-216.
50. **Cattoir, V.** 2004. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathol Biol* **52**:607-616.
51. **Cavallo, J.** 2004. Bêta-lactamines. EMC-Maladies infectieuses.
52. **Cavallo, J., and A. Mérens.** 2008. Antibacterial spectrum of an antibiotic and clinical categorization. *Pathol Biol* **56**:300-304.
53. **Cavallo, J.-D., Fabre, R, Jehl, F, Rpp, C, Garrabé, E.** 2004. Bêtalactamines. EMC-Maladies infectieuses **1**:129-202.
54. **Cerniglia, C., and S. Kotarski.** 1999. Evaluation of Veterinary Drug Residues in Food for Their Potential to Affect Human Intestinal Microflora. *Regul Toxicol Pharmacol* **29**:238-61.

55. **Chachaty, E., C. Bourneix, S. Renard, M. Bonnay, and A. Andremont.** 1993. Shedding of *Clostridium difficile*, fecal  $\beta$ -lactamase activity, and gastrointestinal symptoms in 51 volunteers treated with oral cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1432-35.
56. **Chachaty, E., C. Depitre, N. Mario, C. Bourneix, P. Saulnier, G. Corthier, and A. Andremont.** 1992. Presence of *Clostridium difficile* and antibiotic and  $\beta$ -lactamase activities in feces of volunteers treated with oral cefixime, oral cefpodoxime proxetil, or placebo. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:2009-13.
57. **Chopra, I., A. O'Neill, and K. Miller.** 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updates* **6**:137-145.
58. **CLSI.** 2007. Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; Approved Guideline-Third Edition. **M37-A3Vol. 0 No. 0 Replaces M37-A2Vol. 22 No. 7.**
59. **Coburn, P. S., A. S. Baghdayan, G. T. Dolan, and N. Shankar.** 2007. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol Microbiol* **63**:530-44.
60. **Coque, T. M., A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Canton, and P. Nordmann.** 2008. Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* **14**:195-200.
61. **Courvalin, P.** 2006. AntibioGramme.
62. **Courvalin, P.** 2008. Bacterial antibiotic resistance: combinations of biochemical and genetic mechanisms. *Bulletin-Académie vétérinaire de France* **161**:7.
63. **Courvalin, P.** 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **38**: 1447-51
64. **Craig, W.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* **26**:1-12.
65. **Craig, W., and D. Andes.** 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **15**:255.
66. **Dagan, R., K. Klugman, W. Craig, and F. Baquero.** 2001. Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* **47**:129.
67. **Dahl, K. H., D. D. Mater, M. J. Flores, P. J. Johnsen, T. Midtvedt, G. Corthier, and A. Sundsfjord.** 2007. Transfer of plasmid and chromosomal glycopeptide resistance determinants occurs more readily in the digestive tract of mice than *in vitro* and exconjugants can persist stably *in vivo* in the absence of glycopeptide selection. *J Antimicrob Chemother* **59**:478-486.
68. **David, M.** 2007. Conference of World Organization for Animal Health (OIE) Updates. *United States Health Association* **110**:650.
69. **Davies, J.** 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants **207**:15-27.
70. **Davison, J.** 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**:73-91.
71. **Denton, M.** 2007. *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* **29 Suppl 3**:S9-S22.
72. **Donskey, C.** 2006. Antibiotic Regimens and Intestinal Colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Clin Infect Dis* **43**:62-69.

73. **Donskey, C.** 2004. The Role of the Intestinal Tract as a Reservoir and Source for Transmission of Nosocomial Pathogens. *Clin Infect Dis* **39**:219-226.
74. **Doré, K., J. Buxton, B. Henry, F. Pollari, D. Middleton, M. Fyfe, R. Ahmed, P. Michel, A. King, and C. Tinga.** 2004. Risk factors for *Salmonella Typhimurium* DT104 and non-DT104 infection: a Canadian multi-provincial case-control study. *Epidemiol Infect* **132**:485-493.
75. **Doucet-Populaire, F., P. Trieu-Cuot, I. Dosbaa, A. Andremont, and P. Courvalin.** 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:185-7.
76. **Drasar, B., and P. Barrow.** 1985. Intestinal microbiology. American Society for Microbiology Washington, DC.
77. **Dutour, C., R. Bonnet, H. Marchandin, M. Boyer, C. Chanal, D. Sirot, and J. Sirot.** 2002. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14  $\beta$ -lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:534-7.
78. **Dutta, C., and A. Pan.** 2002. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *J. Biosci.* **27**:27-33.
79. **Duval-Iflah, Y., P. Raibaud, C. Tancrede, and M. Rousseau.** 1980. R-plasmic transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo* in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. *Infect Immun* **28**:981-90.
80. **Duverne, C., A. Bouten, A. Deslandes, J. Westphal, J. Trouvin, R. Farinotti, and C. Carbon.** 1992. Modification of cefixime bioavailability by nifedipine in humans: involvement of the dipeptide carrier system. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:2462-2467.
81. **Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**:1635-8.
82. **Eckert, C., V. Gautier, M. Saladin-Allard, N. Hidri, C. Verdet, Z. Ould-Hocine, G. Barnaud, F. Delisle, A. Rossier, T. Lambert, A. Philippon, and G. Arlet.** 2004. Dissemination of CTX-M-type  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1249-55.
83. **Eddershaw, P., A. Beresford, and M. Bayliss.** 2000. ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. *Drug Discov Today* **5**:409-414.
84. **Egorova, S., M. Timinouni, M. Demartin, S. Granier, J. Whichard, V. Sangal, L. Fabre, A. Delauné, M. Pardos, and Y. Millemann.** 2008. Ceftriaxone-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Newport, France. *Emerg Infect Dis* **14**:954.
85. **Espie, E., H. De Valk, V. Vaillant, N. Quelquejeu, F. Lequerrec, and F. Weill.** 2004. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections linked to the consumption of imported horse meat in France. *Epidemiol Infect* **133**:373-376.
86. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, I.** [www.eucast.org](http://www.eucast.org) (16 april 2009, date last accessed).
87. **Falcao, J., F. Sharp, and V. Sperandio.** 2004. Cell-to-cell signaling in intestinal pathogens. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **5**:9-18.
88. **Faulkner, R. D., W. Bohaychuk, R. A. Lanc, J. D. Haynes, R. E. Desjardins, A. Yacobi, and B. M. Silber.** 1988. Pharmacokinetics of cefixime in the young and elderly. *J Antimicrob Chemother* **21**:787-94.

89. **Faulkner, R. D., P. Fernandez, G. Lawrence, L. L. Sia, A. J. Falkowski, A. I. Weiss, A. Yacobi, and B. M. Silber.** 1988. Absolute bioavailability of cefixime in man. *J Clin Pharmacol* **28**:700-6.
90. **Faulkner, R. D., A. Yacobi, J. S. Barone, S. A. Kaplan, and B. M. Silber.** 1987. Pharmacokinetic profile of cefixime in man. *Pediatr Infect Dis J* **6**:963-70.
91. **Feld, L., S. Schjorring, K. Hammer, T. R. Licht, M. Danielsen, K. Krogh, and A. Wilcks.** 2008. Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment. *J Antimicrob Chemother.*
92. **Fernández, A., A. Cloeckaert, A. Bertini, K. Praud, B. Doublet, F. Weill, and A. Carattoli.** 2007. Comparative Analysis of IncHI2 Plasmids Carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> or *bla*<sub>CTX-M-9</sub> from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strains Isolated from Poultry and Humans. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4177-4180.
93. **Filutowicz, M., R. Burgess, R. Gamelli, J. Heinemann, B. Kurenbach, S. Rakowski, and R. Shankar.** 2008. Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid* **60**:38-44.
94. **Fluit, A., and F. Schmitz.** 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* **10**:272-288.
95. **Fontenoy A. M., L. C., S. Corvec S., Juvin M.E., Caillon J., Guille Des Buttes A. C., Reynaud A., Lepelletier D.** 2008. Evolution de la proportion des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (ESBLSE) et impact sur les précautions complémentaires d'hygiène. 28e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse **ABSt. 112/250**.
96. **Forrest, A., D. Nix, C. Ballow, T. Goss, M. Birmingham, and J. Schentag.** 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1073-1081.
97. **Frye, J., and P. Fedorka-Cray.** 2007. Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. *Int J Antimicrob Agents* **30**:134-142.
98. **Garcia, A., F. Navarro, E. Miro, B. Mirelis, S. Campoy, and P. Coll.** 2005. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother* **56**:819-26.
99. **Garfarro, R., and T. Lavrut.** 2005. Signification clinique des corrélations pharmacocinétique/pharmacodynamie des antibiotiques chez les patients de réanimation. *Réanimation (Paris)* **14**:264-275.
100. **Garnier, F., K. Gambarotto, F. Denis, and M. Ploy.** 2004. Molecular study of vancomycin-resistant enterococci isolated from humans and from food in a cattle-rearing area of France, *J Antimicrob Chemother* **54**: 236-239.
101. **Garraffo, R., and T. Lavrut.** 2005. The clinical importance of relationship between antibiotic pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters in critical ill patients. *Réanimation* **14**:264-275.
102. **Ghuysen, J. M.** 1990. Membrane topology, structure, and functions of the penicillin-interactive proteins. *Biotechnol Appl Biochem* **12**:468-72.
103. **Girlich, D., L. Poirel, A. Carattoli, I. Kempf, M. F. Lartigue, A. Bertini, and P. Nordmann.** 2007. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* **73**:4681-5.

104. **Grohs, P., Kac, G., Frazier, I., Castano, A., Meyer, G., Podglajen, I.** 2008. L'hôpital participe-t-il à la diffusion de *E. coli* BLSE? 28e Reunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse **Abst. 5/8**.
105. **Gruzza, M., Y. Duval-Iflah, and R. Ducluzeau.** 1992. Colonization of the digestive tract of germ-free mice by genetically engineered strains of *Lactococcus lactis*: study of recombinant DNA stability. *Microb Releases* **1**:165-71.
106. **Gruzza, M., M. Fons, M. F. Ouriet, Y. Duval-Iflah, and R. Ducluzeau.** 1994. Study of gene transfer in vitro and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora. *Microb Releases* **2**:183-9.
107. **Gruzza, M., P. Langella, Y. Duval-Iflah, and R. Ducluzeau.** 1993. Gene transfer from engineered *Lactococcus lactis* strains to *Enterococcus faecalis* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Microb Releases* **2**:121-5.
108. **Guay, D., R. Meatherall, G. Harding, and G. Brown.** 1986. Pharmacokinetics of cefixime (CL 284,635; FK 027) in healthy subjects and patients with renal insufficiency. *Antimicrob Agents Chemother* **30**:485-490.
109. **Halidou, p.-G. A., Kempf I., Caroff N., Laurentie M., Sanders P.** 2008. relationship between resistance to third generation cephalosporins and phylogenetic groups of *Escherichia coli* from food animals. 4th Annual Scientific Meeting of medVetNet **Abst. AR10**.
110. **Hart, W. S., M. W. Heuzenroeder, and M. D. Barton.** 2006. A study of the transfer of tetracycline resistance genes between *Escherichia coli* in the intestinal tract of a mouse and a chicken model. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**:333-40.
111. **Heritage, J., F. H. M'Zali, D. Gascoyne-Binzi, and P. M. Hawkey.** 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* **44**:309-18.
112. **Jacobs, C.** 1997. Life in the Balance: Cell Walls and Antibiotic Resistance. *Science* **278**:1731.
113. **Jacobsen, L., A. Wilks, K. Hammer, G. Huys, D. Gevers, and S. R. Andersen.** 2006. Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiol Ecol*.
114. **Jacoby, G., and K. Bush.** 2005.  $\beta$ -Lactam Resistance in the 21st Century. *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy*. ASM Press, Washington, DC:53–65.
115. **Johnsen, P. J., G. S. Simonsen, O. Olsvik, T. Midtvedt, and A. Sundsfjord.** 2002. Stability, persistence, and evolution of plasmid-encoded VanA glycopeptide resistance in enterococci in the absence of antibiotic selection in vitro and in gnotobiotic mice. *Microb Drug Resist* **8**:161-70.
116. **Kahlmeter, G., D. Brown, F. Goldstein, A. MacGowan, J. Mouton, A. Osterlund, A. Rodloff, M. Steinbakk, P. Urbaskova, and A. Vatopoulos.** 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother* **52**:145.
117. **Kasuya, M.** 1964. Transfer of Drug Resistance between Enteric Bacteria Induced in the Mouse Intestine. *J Bacteriol* **88**:322-8.

118. **Kaye, K., A. Harris, H. Gold, and Y. Carmeli.** 2000. Risk Factors for Recovery of Ampicillin-Sulbactam-Resistant *Escherichia coli* in Hospitalized Patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1004-1009.
119. **Khan, A., M. Nawaz, S. Khan, and C. Cerniglia.** 2001. Identification of predominant human and animal anaerobic intestinal bacterial species by terminal restriction fragment patterns (TRFPs): a rapid, PCR-based method. *Mol Cell Probes* **15**:349-355.
120. **Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and S. Mitsuhashi.** 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**:315-317.
121. **Kumar, A., and H. P. Schweizer.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Delivery Rev* **57**:1486-1513.
122. **Labaune, J., and J. Wepierre.** 1984. Pharmacocinétique: principes fondamentaux. Masson.
123. **Lartigue, M. F., L. Poirel, D. Aubert, and P. Nordmann.** 2006. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>CTX-M</sub> of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1282-6.
124. **Launay, A., S. A. Ballard, P. D. Johnson, M. L. Grayson, and T. Lambert.** 2006. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1054-62.
125. **Laupland, K., D. Church, J. Vidakovich, M. Mucenski, and J. Pitout.** 2008. Community-onset extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: Importance of international travel. *J Infect.* **5**:20-6.
126. **Lavigne, J. P., H. Marchandin, J. Delmas, J. Moreau, N. Bouziges, E. Lecaillon, L. Cavalie, H. Jean-Pierre, R. Bonnet, and A. Sotto.** 2007. CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in French hospitals: prevalence, molecular epidemiology, and risk factors. *J Clin Microbiol* **45**:620-6.
127. **Lavilla, S., J. Gonzalez-Lopez, E. Miro, A. Dominguez, M. Llagostera, R. Bartolome, B. Mirelis, F. Navarro, and G. Prats.** 2008. Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *J Antimicrob Chemother* **61**:1244.
128. **Lavollay, M., K. Mamlouk, T. Frank, A. Akpabie, B. Burghoffer, S. Ben Redjeb, R. Bercion, V. Gautier, and G. Arlet.** 2006. Clonal dissemination of a CTX-M-15  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2433-38.
129. **Leclercq, R., E. Derlot, M. Weber, J. Duval, and P. Courvalin.** 1989. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:10-5.
130. **Lesens, O. B., O; Aumeran; C ; Bonnet, R; Souweine, B; Traoré, O.** 2008. Epidémiologie et contrôle des entérocoques résistants aux glycopeptides au centre hospitalier universitaire de Clermont-Ferrand, France, 2004-2007. *Bull Epidemiol Hebdom-InVS* **41-42**.
131. **Lester, C. H., N. Frimodt-Moller, and A. M. Hammerum.** 2004. Conjugal transfer of aminoglycoside and macrolide resistance between *Enterococcus faecium* isolates in the intestine of streptomycin-treated mice. *FEMS Microbiol Lett* **235**:385-91.

132. **Lester, C. H., N. Frimodt-Moller, T. L. Sorensen, D. L. Monnet, and A. M. Hammerum.** 2006. *In vivo* transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:596-9.
133. **Levy, S., B. Marshall, S. Schluederberg, D. Rowse, and J. Davis.** 1988. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:1801-1806.
134. **Levy, S. B.** 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Found Symp* **207**:1-9.
135. **Levy, S. B., and B. Marshall.** 1981. Risk assessment studies of *E. coli* host-vector systems. *Recomb DNA Tech Bull* **4**:91-8.
136. **Lewis, J. S., 2nd, M. Herrera, B. Wickes, J. E. Patterson, and J. H. Jorgensen.** 2007. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4015-21.
137. **Li, X.-Z., M. Mehrotra, S. Ghimire, and L. Adewoye.** 2007.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol* **121**:197-214.
138. **Licht, T. R., B. B. Christensen, K. A. Krogfelt, and S. Molin.** 1999. Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiol* **145 ( Pt 9)**:2615-22.
139. **Licht, T. R., D. Laugesen, L. B. Jensen, and B. L. Jacobsen.** 2002. Transfer of the pheromone-inducible plasmid pCF10 among *Enterococcus faecalis* microorganisms colonizing the intestine of mini-pigs. *Appl Environ Microbiol* **68**:187-193.
140. **Licht, T. R., C. Struve, B. B. Christensen, R. L. Poulsen, S. Molin, and K. A. Krogfelt.** 2003. Evidence of increased spread and establishment of plasmid RP4 in the intestine under sub-inhibitory tetracycline concentrations. *FEMS Microbiol Ecol* **44**:217-223.
141. **Licht, T. R., and A. Wilcks.** 2006. Conjugative gene transfer in the gastrointestinal environment. *Adv Appl Microbiol* **58**:77-95.
142. **Liebana, E., M. Batchelor, K. Hopkins, F. Clifton-Hadley, C. Teale, A. Foster, L. Barker, E. Threlfall, and R. Davies.** 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* **44**:1630-1634.
143. **Liebana, E., M. Gibbs, C. Clouting, L. Barker, F. A. Clifton-Hadley, E. Pleydell, B. Abdalhamid, N. D. Hanson, L. Martin, C. Poppe, and R. H. Davies.** 2004. Characterization of beta-lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains from food-producing animals in the United Kingdom. *Microb Drug Resist* **10**:1-9.
144. **Liu, P., K. H. Rand, B. Obermann, and H. Derendorf.** 2005. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibacterial activity of cefpodoxime and cefixime in in vitro kinetic models. *Int J Antimicrob Agents* **25**:120-9.
145. **Livermore, D., and P. Hawkey.** 2005. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother* **56**:451.
146. **Livermore, D. M.** 1995. beta-lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**:557-584.

147. **Livermore, D. M., R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T. M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel, and N. Woodford.** 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* **59**:165-74.
148. **Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:725-774.
149. **Mainardi, J. L.** 2008. Mode d'action et activité anti-bactérienne des molécules à venir: ceftobiprole, lipo-glycopeptides. 28e Reunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse **Abst.35/8**.
150. **Mammeri, G.** 2008. Role of the ser-287-Asn replacement in the hydrolysis spectrum extension of Ampc  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. 28e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. **Abst.37/11**.
151. **Manson, J. M., S. Keis, J. M. Smith, and G. M. Cook.** 2003. A clonal lineage of VanA-type *Enterococcus faecalis* predominates in vancomycin-resistant *Enterococci* isolated in New Zealand. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:204-10.
152. **Massova, I., and S. Mobashery.** 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1-17.
153. **Mater, D. D., P. Langella, G. Corthier, and M. J. Flores.** 2005. Evidence of vancomycin resistance gene transfer between enterococci of human origin in the gut of mice harbouring human microbiota. *J Antimicrob Chemother* **56**:975-8.
154. **Matsumoto, Y., A. Ikemoto, Y. Wakai, F. Ikeda, S. Tawara, and K. Matsumoto.** 2001. Mechanism of therapeutic effectiveness of cefixime against typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2450-4.
155. **Meunier, D., E. Jouy, C. Lazizzera, M. Kobisch, and J.-Y. Madec.** 2006. CTX-M-1- and CTX-M-15-type  $\beta$ -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *J Antimicrob Agents* **28**:402-7.
156. **Miriagou, V., P. Tassios, N. Legakis, and L. Tzouvelekis.** 2004. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents* **23**:547-555.
157. **Morelli, L., P. G. Sarra, and V. Bottazzi.** 1988. *In vivo* transfer of pAM  $\beta$ 1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol* **65**:371-5.
158. **Moubareck, C., N. Bourgeois, P. Courvalin, and F. Doucet-Populaire.** 2003. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2993-6.
159. **Moubareck, C., M. Lecso, E. Pinloche, M. J. Butel, and F. Doucet-Populaire.** 2007. Inhibitory impact of bifidobacteria on the transfer of  $\beta$ -lactam resistance among *Enterobacteriaceae* in the gnotobiotic mouse digestive tract. *Appl Environ Microbiol* **73**:855-60.
160. **Moulin, G., P. Cavalie, I. Pellanne, A. Chevance, A. Laval, Y. Millemann, P. Colin, and C. Chauvin.** 2008. A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *J Antimicrob Chemother.* **16**: 29-30.
161. **Naas, T., A. Lezzar, C. Bentchouala, F. Smati, J. Scheftel, H. Monteil, and P. Nordmann.** 2005. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Senftenberg isolates producing CTX-M  $\beta$ -lactamases from Constantine, Algeria, *J Antimicrob Chemother*, **56**: 439-440.

162. **Nijsten, R., N. London, A. van den Bogaard, and E. Stobberingh.** 1996. Antibiotic resistance among *Escherichia coli* isolated from faecal samples of pig farmers and pigs. *J Antimicrob Chemother* **37**:1131-1140.
163. **Nijsten, R., N. London, A. van den Bogaard, and E. Stobberingh.** 1995. *In-vivo* transfer of resistance plasmids in rat, human or pig-derived intestinal flora using a rat model. *J Antimicrob Chemother* **36**:975-85.
164. **Nordmann, P.** 1998. Trends in  $\beta$ -Lactam Resistance Among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* **27**:100-106.
165. **Nordmann, P., and L. Poirel.** 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* **8**:321-31.
166. **Novais, A., R. Canton, R. Moreira, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2007. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:796-9.
167. **Novais, A., R. Canton, A. Valverde, E. Machado, J.-C. Gala?n, L. Peixe, A. Carattoli, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2006. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2741-50.
168. **Ochs, M. M., M. P. McCusker, M. Bains, and R. E. Hancock.** 1999. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1085-90.
169. **ONERBA.** 2005. Rapport d'activité 2005.
170. **Paterson, D. L., and R. A. Bonomo.** 2005. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**:657-86.
171. **Paulsen, I., L. Banerjee, G. Myers, K. Nelson, R. Seshadri, T. Read, D. Fouts, J. Eisen, S. Gill, and J. Heidelberg.** 2003. Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*, *Science*, **299**: 2071-2074.
172. **Peña, C., C. Gudiol, L. Calatayud, F. Tubau, M. Domínguez, M. Pujol, J. Ariza, and F. Gudiol.** 2008. Infections due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase among hospitalised patients: factors influencing mortality. *J Hosp Infect* **68**:116-122.
173. **Perez-Mendoza, D., and F. de la Cruz.** 2009. *Escherichia coli* genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: Are there any *BMC Genomics* **10**:71.
174. **Perrin-Guyomard, A., S. Cottin, D. E. Corpet, J. Boisseau, and J. M. Poul.** 2001. Evaluation of residual and therapeutic doses of tetracycline in the human-flora-associated (HFA) mice model. *Regul Toxicol Pharmacol* **34**:125-36.
175. **Perrin-Guyomard, A., J. M. Poul, D. E. Corpet, P. Sanders, A. H. Fernandez, and M. Bartholomew.** 2005. Impact of residual and therapeutic doses of ciprofloxacin in the Human-Flora-Associated (HFA) mice model. *Regul Toxicol Pharmacol*:In press.
176. **Phillipon, A., G. Arlet, and G. Jacoby.** 2002. Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1-11.
177. **Phillipon, A., V. Jarlier, P. Legrand, G. Fournier, M. H. Nicolas, and J. Duval.** 1989. Antibacterial activity of cefixime in presence of  $\beta$ -lactamases produced by *Enterobacteriaceae*. *Presse medicale* **18**:1560-1566.

178. **Pitout, J., P. Nordmann, K. Laupland, and L. Poirel.** 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* **56**:52-59.
179. **Pitout, J. D., and K. B. Laupland.** 2008. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* **8**:159-66.
180. **Ploy, M. C., T. Lambert, J. P. Couty, and F. Denis.** 2000. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med* **38**:483-7.
181. **Poeta, P., H. Radhouani, G. Igrejas, A. Goncalves, C. Carvalho, J. Rodrigues, L. Vinue, S. Somalo, and C. Torres.** 2008. Seagulls of Berlengas Natural Reserve of Portugal as carriers of faecal *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M and TEM classes. *Appl Environ Microbiol.* **13**:803-5.
182. **Poirel, L., M. Gniadkowski, and P. Nordmann.** 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3, *J Antimicrob Chemother*, **50** :1031-1034.
183. **Poirel, L., L. Villa, A. Bertini, J. D. Pitout, P. Nordmann, and A. Carattoli.** 2007. Expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **13**:803-5.
184. **Poole, T. L., J. L. McReynolds, T. S. Edrington, J. A. Byrd, T. R. Callaway, and D. J. Nisbet.** 2006. Effect of flavophospholipol on conjugation frequency between *Escherichia coli* donor and recipient pairs *in vitro* and in the chicken gastrointestinal tract. *J Antimicrob Chemother* **58**:359-66.
185. **Poppe, C., L. C. Martin, C. L. Gyles, R. Reid-Smith, P. Boerlin, S. A. McEwen, J. F. Prescott, and K. R. Forward.** 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **71**:1184-92.
186. **Prevention and Centers for Disease Control** 2002. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*
187. **Prudhomme, M., L. Attaiech, G. Sanchez, B. Martin, and J. Claverys.** 2006. Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **313**:89-92.
188. **Quinn, J., C. DiVincenzo, and J. Foster.** 1987. Emergence of resistance to ceftazidime during therapy for *Enterobacter cloacae* infections. *J Infect Dis* **155**:942-947.
189. **Quinn, J., D. Miyashiro, D. Sahm, R. Flamm, and K. Bush.** 1989. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:1451-1456.
190. **Rankin, S., H. Aceto, J. Cassidy, J. Holt, S. Young, B. Love, D. Tewari, D. Munro, and C. Benson.** 2002. Molecular Characterization of Cephalosporin-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolates from Animals in Pennsylvania. *Journal of Clinical Microbiology* **40**:4679-84.
191. **Roberts, A., and P. Mullany.** 2005. The conjugative transposons: Integrative gene transfer elements. *The Dynamic Bacterial Genome* **2**:79-84.
192. **Roberts, A. P., M. Chandler, P. Courvalin, G. Guedon, P. Mullany, T. Pembroke, J. I. Rood, C. Jeffery Smith, A. O. Summers, M. Tsuda, and D. E.**

- Berg.** 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*. **14**: 80-3.
193. **Roberts, M., B. Magnusson, F. Burczynski, and M. Weiss.** 2002. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **41**:751.
194. **Rodriguez-Bano, J., M. Navarro, L. Romero, M. Muniain, M. Cueto, M. Rios, J. Hernandez, and A. Pascual.** 2006. Bacteremia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* **43**:1407-1414.
195. **Rodriguez-Bano, J., M. D. Navarro, L. Romero, M. A. Muniain, M. Cueto, J. Galvez, E. J. Perea, and A. Pascual.** 2008. Risk-factors for emerging bloodstream infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* **14**:180-3.
196. **Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies, and D. Mazel.** 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrans provides an ancestry for multiresistant integrans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:652-7.
197. **Rowe-Magnus, D. A., and D. Mazel.** 2001. Integrans: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol* **4**:565-9.
198. **Rybak, M. J.** 2006. Pharmacodynamics: Relation to antimicrobial resistance. *Am J Infect Control* **34**:S38-S45.
199. **Sabate, M., F. Navarro, E. Miro, S. Campoy, B. Mirelis, J. Barbe, and G. Prats.** 2002. Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2656-61.
200. **Sakamoto, H., T. Hirose, and Y. Mine.** 1985. Pharmacokinetic of FK037 in rats and dogs. *J Antibiot (Tokyo)* **38**:496-504.
201. **Sakamoto, H., T. Hirose, S. Nakamoto, K. Hatano, F. Shibayama, H. Kikuchi, Y. Mine, and S. Kuwahara.** 1988. Pharmacokinetic of FK482, a new orally active cephalosporin, in animals. *J Antibiot (Tokyo)* **41**:1896-1905.
202. **Schentag, J.** 2000. Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. *Clin Infect Dis* **31**:40-44.
203. **Schentag, J.** 1990. Correlation of pharmacokinetic parameters to efficacy of antibiotics: relationships between serum concentrations, MIC values, and bacterial eradication in patients with gram-negative pneumonia. *Scand J Infect Dis Suppl* **74**:218-34.
204. **Schorderet, M., and C. Neuroléptiques.** 1998. *Pharmacologie: Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques* 3rd edition. Edition Frison-Roche.
205. **Schwaber, M., S. Navon-Venezia, K. Kaye, R. Ben-Ami, D. Schwartz, and Y. Carmeli.** 2006. Clinical and Economic Impact of Bacteremia with Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1257-1262.
206. **Scott, J., and G. Churchward.** 1995. Conjugative Transposition. *Annual Reviews in Microbiology* **49**:367-397.
207. **Société Française de Microbiologie, A.** <http://sfm.asso.fr>. 16 april 2009, date last accessed).
208. **Soussy, C., J. Cavallo, H. Chardon, C. Chidiac, P. Choutet, P. Courvalin, H. Dabernat, H. Drugeon, L. Dubreuil, and F. Goldstein.** 2007. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2007, Ed. Janvier 2007. Société Française de Microbiologie, Paris, France.

209. **Spratt, B. G., and K. D. Cromie.** 1988. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* **10**:699-711.
210. **Steen, S., and P. Webb.** 2007. ESBL-producing bacteria isolated from companion animals. *Vet Rec* **161**:795.
211. **Steidler, L., and P. Rottiers.** 2006. Therapeutic Drug Delivery by Genetically Modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad Sci* **1072**:176-186.
212. **Su, L. H., C. H. Chiu, C. Chu, M. H. Wang, J. H. Chia, and T. L. Wu.** 2003. In vivo acquisition of ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serotype anatum. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:563-7.
213. **Sullivan, A., C. Edlund, and C. Nord.** 2001. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis* **1**:101-14.
214. **Suvorov, M., S. B. Vakulenko, and S. Mobashery.** 2007. Cytoplasmic-membrane anchoring of a class A  $\beta$ -lactamase and its capacity in manifesting antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2937-42.
215. **Sylvie, P.** 2007. Dictionnaire des médicaments vétérinaires (DMV) et des produits de santé animale commercialisés en France 2007 (14<sup>Éd.</sup>).
216. **Thomas, C. M., and K. M. Nielsen.** 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:711-21.
217. **Threlfall, E. J., I. S. Fisher, C. Berghold, P. Gerner-Smidt, H. Tschape, M. Cormican, I. Luzzi, F. Schnieder, W. Wannet, J. Machado, and G. Edwards.** 2003. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill* **8**:41-5.
218. **Threlfall, E. J., C. J. Teale, R. H. Davies, L. R. Ward, J. A. Skinner, A. Graham, C. Cassar, and K. Speed.** 2003. A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal salmonellas from humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microb Drug Resist* **9**:183-9.
219. **Toutain, P., and A. Bousquet-Melou.** 2004. Bioavailability and its assessment. *J Vet Pharmacol Ther* **27**:455-466.
220. **Toutain, P., and A. Bousquet-Melou.** 2004. Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther* **27**:441-453.
221. **Toutain, P., J. del Castillo, and A. Bousquet-Mélou.** 2002. The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci* **73**:105-114.
222. **Toutain, P., and P. Lees.** 2004. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* **27**:467-477.
223. **Tumbarello, M., M. Sanguinetti, E. Montuori, E. Trecarichi, B. Posteraro, B. Fiori, R. Citton, T. D'Inzeo, G. Fadda, and R. Cauda.** 2007. Predictors of Mortality in Patients with Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Importance of Inadequate Initial Antimicrobial Treatment? *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1987-1994.
224. **Turnidge, J.** 1998. The Pharmacodynamics of  $\beta$ -Lactams. *Clin Infect Dis* **27**:10-22.
225. **Valverde, A., F. Grill, T. Coque, V. Pintado, F. Baquero, R. Canton, and J. Cobo.** 2008. High rate of Intestinal Colonization with Extended Spectrum  $\beta$  - Lactamases Producing Organisms in Household Contacts of Infected Community Patients. *J Clin Microbiol.*

226. **Van den Bogaard, A., N. London, C. Driessen, and E. Stobberingh.** 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers, *J Antimicrob Chemother* **47**: 763-771.
227. **Van Den Bogaard, A., and E. Stobberingh.** 1999. Antibiotic Usage in Animals: Impact on Bacterial Resistance and Public Health. *Drugs* **58**:589.
228. **Van den Bogaard, A., R. Willems, N. London, J. Top, and E. Stobberingh.** 2002. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers, *J Antimicrob Chemother* **49**: 497-505.
229. **Varma, J., K. Moelbak, T. Barrett, J. Beebe, T. Jones, T. Rabatsky-Ehr, K. Smith, D. Vugia, H. Chang, and F. Angulo.** 2005. Antimicrobial-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* Is Associated with Excess Bloodstream Infections and Hospitalizations. *J Infect Dis* **191**:554-561.
230. **VIDAL.** [www.vidalpro.net](http://www.vidalpro.net) (17 avril 2009, date du dernier accès).
231. **Walsh, C.** 2003. Antibiotics : actions, origins, resistance. American Society for Microbiology press, Washington, D. C.
232. **Walters, M., and V. Sperandio.** 2006. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* **296**:125-131.
233. **Warren, R., V. Ensor, P. O'Neill, V. Butler, J. Taylor, K. Nye, M. Harvey, D. Livermore, N. Woodford, and P. Hawkey.** 2008. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* **61**:504.
234. **Weill, F.** 2008. *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires* **68**:37-47.
235. **Weill, F. X., R. Lailier, K. Praud, A. Kerouanton, L. Fabre, A. Brisabois, P. A. Grimont, and A. Cloeckaert.** 2004. Emergence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol* **42**:5767-73.
236. **Westphal, J., F. Jehl, M. Schloegel, H. Monteil, and J. Brogard.** 1993. Biliary excretion of cefixime: assessment in patients provided with T-tube drainage. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1488-1491.
237. **Whittle, G., N. Shoemaker, and A. Salyers.** 2002. Characterization of Genes Involved in Modulation of Conjugal Transfer of the *Bacteroides* Conjugal Transposon CTnDOT. *J Bacteriol* **184**:3839-3847.
238. **Winokur, P., A. Brueggemann, D. DeSalvo, L. Hoffmann, M. Apley, E. Uhlenhopp, M. Pfaller, and G. Doern.** 2000. Animal and Human Multidrug-Resistant, Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Isolates Expressing a Plasmid-Mediated CMY-2 AmpC  $\beta$ -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2777-2783.
239. **Winokur, P., D. Vonstein, L. Hoffman, E. Uhlenhopp, and G. Doern.** 2001. Evidence for Transfer of CMY-2 AmpC  $\beta$ -Lactamase Plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Food Animals and Humans. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2716-2722.
240. **Wu, S., E. Chouliara, H. Hasman, A. Dalsgaard, A. Vieira, and L. Jensen.** 2008. Detection of a single isolate of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* from healthy pigs in Denmark. *J Antimicrob Chemother* **61**:747.
241. **Zhao, S., S. Qaiyumi, S. Friedman, R. Singh, S. Foley, D. White, P. McDermott, T. Donkar, C. Bolin, and S. Munro.** 2003. Characterization of

- Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. J Clin Microbiol **41**:5366-5371.
242. **Zhao, S., D. G. White, P. F. McDermott, S. Friedman, L. English, S. Ayers, J. Meng, J. J. Maurer, R. Holland, and R. D. Walker.** 2001. Identification and expression of cephamycinase *bla*<sub>CMY</sub> genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. Antimicrob Agents Chemother **45**:3647-50.

## **Transfert d'un gène de résistance aux $\beta$ -lactamines $bla_{\text{CTX-M-9}}$ entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : influence d'un traitement antibiotique**

La dissémination mondiale de la résistance aux  $\beta$ -lactamines est un problème de santé publique majeur. Les voies de transmission de la résistance sont mal connues, néanmoins de nombreux arguments attestent du potentiel transfert de bactéries résistantes et de gènes de résistance entre l'animal et l'homme. L'objectif du présent travail est d'évaluer le transfert du gène de résistance  $bla_{\text{CTX-M-9}}$  entre une souche d'origine animale, *Salmonella enterica* Virchow et les entérobactéries de la flore humaine, et l'impact d'un traitement à une  $\beta$ -lactamine sur ce transfert. Dans un modèle de rat associé à une flore humaine, le transfert du gène de résistance n'est pas détectable entre *S. enterica* Virchow et les entérobactéries de la flore. Pourtant l'inoculation concomitante d'une souche d'*Escherichia coli* suffit à observer la diffusion du gène de résistance. La pression de sélection ne permet pas d'augmenter le transfert de gène mais contribue largement à la sélection et à la colonisation de salmonelles résistantes dans le tractus digestif. L'analyse des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques confirme également la pertinence des critères de substitution dans la prédiction de l'efficacité d'un traitement au céfixime en présence de telles souches. L'une des stratégies thérapeutiques proposée consiste à utiliser une combinaison de  $\beta$ -lactamines et d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

## **Transfer of resistance gene $bla_{\text{CTX-M-9}}$ between *Salmonella* and enterobacteria from human-flora : impact of $\beta$ -lactam**

The global spread of resistance to  $\beta$ -lactam is a major public health problem. The transmission routes of resistance are poorly understood, however, many arguments attest of the potential transfer of resistant bacteria and resistance gene between animals and humans. The purpose of this work is to evaluate the transfer of a resistance gene from an animal strain, *Salmonella enterica* Virchow to enterobacteria from human flora and the impact of a treatment with a  $\beta$ -lactam. In rat-human flora associated, the transfer of resistance gene is not detectable between *S. enterica* Virchow and enterobacteria from human flora. However, inoculation of a recipient strain *E. coli* is enough to observe the transmission of resistance gene. Selection pressure does not increase the gene transfer but contributes significantly to the selection and colonization of resistant *Salmonella* in the gastrointestinal tract. Considering pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters, we confirm that the dose of the antibiotic is not appropriate in the presence of such strains. One of the proposed therapeutic strategies is to use a combination of  $\beta$ -lactamase inhibitors and  $\beta$ -lactam.

Discipline : Biologie

Mots clés:  $\beta$ -lactamines, résistance aux antibiotiques, *Salmonella*, transfert horizontal, entérobactéries, flore intestinale humaine.