

# RAPPORT DE STAGE

ROBERT Clarisse

Master 2

Microbiologie Environnement Santé



## Étude de l'antibiorésistance pour mieux comprendre et prévenir la circulation des bactéries multirésistantes à La Réunion

CIRAD - UMR ASTRE -  
Saint Denis, La Réunion  
France

Sous la direction des  
Dr David A WILKINSON  
Dr Cécile SQUARZONI DIAW

2023  
2024

## Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers l'ensemble de l'équipe ASTRE du Cirad m'ayant accueilli si chaleureusement ces 5 derniers mois.

Je remercie particulièrement Dr David Wilkinson, mon co-encadrant de stage, qui m'a accompagné et formé tout au long de cette expérience professionnelle, pour sa bienveillance, sa gentillesse, pour les nombreuses connaissances et compétences qu'il m'a apportées aussi bien en microbiologie, qu'en bioinformatique.

Je suis honorée d'avoir eu l'occasion de travailler à tes côtés et ferai tout mon possible pour mettre en pratique et valoriser les enseignements que tu m'as transmis.

Je remercie le Dr Cécile Squarzoni de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce stage.

Je remercie de plus profond de mon cœur Axelle, mon binôme durant l'intégralité de ce stage, pour m'avoir formé sur le terrain comme en laboratoire, mais également pour toute l'aventure humaine qui tu m'as permis de vivre à tes côtés.

Merci à toute l'équipe et tous les gens que j'ai eu la chance de côtoyer aussi bien au travail que dans ma vie et qui ont de près ou de loin, participé à la réalisation de ce travail.

# SOMMAIRE

**Etude de l'antibiorésistance** : pour mieux comprendre et prévenir la circulation des bactéries multirésistantes à l'île de La Réunion

- **INTRODUCTION** **p.1**
  
- **MATÉRIEL ET MÉTHODES** **p.6**
  - Recrutement des partenaires p.6
  - Échantillonnages et prélèvements p.6
  - Enrichissement des prélèvements p.7
  - Mise en culture des prélèvements p.8
  - Identification des espèces bactériennes p.9
  - Réalisation des antibiogrammes p.9
  - Analyses moléculaires p.11
  - Analyses bioinformatiques p.13
  
- **RÉSULTATS** **p.15**
  - Échantillonnages et prélèvements p.15
  - Identification des espèces bactériennes p.15
  - Analyse de la qualité du séquençage p.16
  - Description des bactéries identifiées p.17
  - Identification des gènes de résistance p.18
  - Analyses des antibiogrammes p.19
  - Etude de cas n°1: *Escherichia coli* BLSE - L03 p.21
  - Etude de cas n°2: *Klebsiella* persistante BLSE - V281.1 p.23
  - Arbres phylogénétiques p.25
  
- **DISCUSSION** **p.27**
  
- **CONCLUSION** **p.30**
  
- **BIBLIOGRAPHIE** **p.31**
  
- **ANNEXES**

## Introduction

L'apparition des antibiotiques a marqué une ère révolutionnaire dans le domaine de la médecine moderne. Ces substances, définies comme des composés chimiques capables d'inhiber la croissance ou de détruire des microorganismes, ont joué un rôle indispensable dans la gestion des infections bactériennes, contribuant ainsi de manière significative à l'amélioration de la santé publique. Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, les antibiotiques ont permis de traiter efficacement des infections graves, réduisant considérablement la morbidité et la mortalité associées à ces affections. Cependant, leur utilisation répandue a conduit à l'émergence préoccupante de la résistance aux antibiotiques.

Actuellement, le phénomène d'antibiorésistance est considéré par l'OMS comme l'une des 10 plus importantes menaces de santé publique. En effet, on estime que plus de 700 000 personnes meurent chaque année à cause d'infections liées aux bactéries résistantes aux antibiotiques. Ce phénomène émerge à la suite d'une pression sélective exercée par un usage inapproprié et excessif des antibiotiques, tant dans les domaines de la santé humaine que dans les secteurs animal et environnemental. Cette résistance, qui compromet sérieusement l'efficacité des traitements, peut entraîner des complications médicales graves. Selon les scénarii les plus pessimistes, ce chiffre pourrait s'établir autour de 10 millions de morts par an et ainsi devenir la première cause de mortalité d'ici 2050. [10], [27].

Ainsi, ce constat souligne l'impératif d'approfondir notre compréhension des mécanismes de résistance, de surveiller de près l'utilisation des antibiotiques et de développer des stratégies innovantes pour faire face à ce défi croissant dans le domaine de la médecine moderne. Cette réalité s'incarne particulièrement dans l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR), capables de défier plusieurs classes d'antibiotiques, accentuant ainsi les préoccupations liées à l'efficacité décroissante de ces médicaments.

### 1. Plan ECOANTIBIO 2

Cet impératif d'agir face à l'antibiorésistance est mis en évidence, à l'échelle nationale, par l'initiation du plan Écoantibio 2 par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. Cette initiative d'ampleur, centrée sur la santé animale, vise à contrer l'antibiorésistance à travers quatre axes stratégiques. Ces axes englobent l'intensification des mesures préventives contre les maladies infectieuses, la sensibilisation aux enjeux de la lutte contre l'antibiorésistance, la mise à disposition d'outils d'évaluation du recours aux antibiotiques, et la vigilance quant à l'application des règles de bon usage, tant à l'échelle nationale qu'internationale. Depuis la mise en place de ce plan, deux des objectifs ont pu être atteints entre 2017 et 2022 avec une diminution de l'exposition de la colistine de 50%, toutes filières confondues ainsi qu'une réduction de 58% de la prévalence d'*Escherichia coli* BLSE sur des prélèvements de poulets de chair sur la même période à l'échelle nationale [23].

### 2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

L'antibiorésistance est un phénomène complexe résultant d'une multitude de mécanismes génétiques (Annexe 1) pouvant différer d'une bactérie à l'autre. Certaines bactéries présentent une résistance naturelle aux antibiotiques, acquise par une transmission verticale et donc héritée génétiquement, due à des caractéristiques anatomiques et physiologiques telles que la présence ou non d'une paroi cellulaire. En effet, la paroi cellulaire chez les bactéries Gram négatives joue un rôle crucial dans l'antibiorésistance en agissant comme une barrière protectrice contre les antibiotiques. Cette paroi externe lipidique, en plus de la couche mince de peptidoglycane, offre une protection supplémentaire aux bactéries en limitant la pénétration des agents antimicrobiens. Les

molécules d'antibiotiques doivent traverser cette double membrane pour atteindre leur cible intracellulaire, ce qui rend souvent les bactéries Gram négatives plus résistantes à de nombreux antibiotiques par rapport aux bactéries Gram positives. De plus, certains mécanismes de résistance impliquent des modifications de la paroi cellulaire, tels que la modification des porines, qui sont des protéines de la membrane externe impliquées dans le transport des antibiotiques [20]. Cependant, notre étude se penche principalement sur la résistance acquise, qui constitue la principale préoccupation dans le domaine de la santé publique. Ce type de résistance résulte d'une pression sélective exercée par une utilisation excessive ou inappropriée d'antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire, et dans l'agriculture, favorisant la prolifération des souches résistantes. Cette forme de résistance implique la transmission horizontale de gènes de résistance, facilitée par des mécanismes de transfert génétique tels que la conjugaison, la transformation et la transduction [2]. La conjugaison, un processus où le matériel génétique est transféré directement entre deux bactéries en contact, se réalise via un pont cytoplasmique, le pilus sexuel, permettant ainsi le transfert d'ADN de la bactérie donneuse à la bactérie receveuse. La transformation bactérienne consiste en la libération d'un fragment d'ADN par une bactérie, incorporée par une autre bactérie capable d'incorporer de l'ADN exogène dans son propre génome. Ces fragments peuvent contenir des gènes de résistance aux antibiotiques, permettant à la bactérie de développer une nouvelle résistance. En outre, la transduction par un bactériophage permet à une bactérie infectée par un virus de transférer des gènes de résistance à d'autres bactéries. L'ADN bactérien encapsulé dans les nouveaux phages infecte ensuite d'autres bactéries, leur conférant ainsi la résistance aux antibiotiques [28].

### **3. Les dynamiques complexe de l'antibiorésistance**

La recherche contemporaine sur la résistance aux antibiotiques offre un aperçu approfondi des dynamiques complexes présentes dans les écosystèmes, les élevages, et les interactions interspécifiques entre animaux sauvages, animaux domestiques, et humains. Ces travaux, fondés sur une approche systémique, analysent de manière approfondie les mécanismes de dissémination de la résistance aux antibiotiques, offrant ainsi des perspectives cruciales sur les ramifications de ce phénomène [7]. Des études sur la dissémination des gènes de résistance dans l'environnement révèlent l'impact de cette propagation sur les écosystèmes aquatiques, avec des implications à long terme sur la santé globale des écosystèmes et potentiellement sur la santé humaine. Ces recherches soulignent l'ampleur de la résistance et ses conséquences possibles. Les écosystèmes, qu'ils soient terrestres ou aquatiques, agissent comme des réservoirs potentiels de gènes de résistance aux antibiotiques, même dans des environnements isolés, mettant en évidence la persistance ubiquitaire de la résistance [3].

Les élevages, en tant que centres de production animale, sont des points critiques pour l'émergence de la résistance aux antibiotiques. Cependant, l'usage d'antibiotiques varie selon les filières avec une utilisation massive d'antibiotiques principalement pour les élevages bovins, notamment laitiers, puis porcins et enfin avicoles. Bien que certains antibiotiques de types tétracyclines, polymyxines ou macrolides sont strictement interdits dans l'alimentation animale en tant que facteurs de croissance au sein de l'Union européenne depuis 2006 [18], des usages prophylactiques d'antibiotiques de type  $\beta$ -lactamine et tétracycline, peuvent être faits dans l'objectif de prévenir certaines maladies au sein de troupeaux. Ainsi, dans certains cas, après un diagnostic et une prescription par un vétérinaire, et pour faciliter l'administration à un groupe d'animaux, des aliments contenant des antibiotiques peuvent être utilisés dans un objectif médical. L'utilisation intensive d'antibiotiques, principalement dans le secteur de l'élevage, peut ainsi engendrer une sélection des souches résistantes [12]. Dans le contexte de cette étude, les recherches de bactéries multirésistantes ont été focalisées sur les filières d'élevages de volailles et de lapins. En outre, il est crucial de souligner que la santé humaine et l'agriculture végétale sont également concernées par l'utilisation d'antibiotiques, bien que dans une moindre mesure que les élevages animaux.

De plus, l'étude des interactions entre différentes populations animales et humaines offre des perspectives clés sur la dissémination de la résistance. Des recherches épidémiologiques ont montré que les échanges microbiens entre animaux sauvages, animaux domestiques et humains créent un réseau complexe de transmission de gènes de résistance [29].

#### **4. Défis de lutte contre l'antibiorésistance à la Réunion**

Dans le contexte de l'île de La Réunion, l'antibiorésistance émerge comme un défi majeur nécessitant une évaluation approfondie de son étendue, la clarification de ses déterminants, et l'élaboration de stratégies de gestion adaptées. La collaboration entre les professionnels de la santé humaine et animale, les chercheurs, et les autorités sanitaires est d'une importance cruciale pour préserver l'efficacité des antibiotiques et maintenir la santé globale des écosystèmes insulaires. L'écosystème insulaire, où les interactions étroites entre humains, animaux et environnement sont prédominantes, favorise la propagation des gènes de résistance. S'ajoutent à ces interactions, un climat tropical propice à la prolifération de bactéries, une errance et une divagation animale importante pouvant favoriser la circulation de ces BMR ainsi qu'une forte densité d'élevages pour un ratio hommes/animaux élevé [11]. De plus, l'absence d'importation d'animaux sur pied dans le cadre des systèmes d'élevages, crée des systèmes de production véritablement insulaires avec un turnover élevé, renforçant ainsi le risque de propagation des agents résistants. Le lien étroit entre l'élevage et l'agriculture accentue également le risque de contamination environnementale, notamment lorsque les engrais d'animaux d'élevage sont utilisés dans les cultures locales telles que les cultures de cannes à sucre [16]. Sur l'île de la Réunion, la gestion des effluents, incluant les eaux usées domestiques, industrielles et agricoles, est également d'une importance cruciale pour prévenir la contamination environnementale et contrôler la propagation des agents pathogènes et des résidus pharmaceutiques, jouant ainsi un rôle essentiel dans la lutte contre l'antibiorésistance. Cependant, cette gestion est complexe en raison de la topographie montagneuse et de la densité élevée de la population concentrée principalement dans les zones côtières, imposant des défis significatifs qui nécessitent des investissements en infrastructures pour garantir un traitement adéquat des eaux usées [9].

Ces dix dernières années, une augmentation inquiétante d'EPC a pu être observée sur l'île chez l'humain dans le contexte hospitalier mais également hors de ce contexte (Annexe 2).

#### **5. L'Approche "One Health" : Une Réponse Globale et Intégrée à la Lutte contre l'Antibiorésistance**

Ces interactions soulignent l'importance d'une approche holistique et intégrée « One Health » dans la compréhension globale de ce phénomène [29]. En intégrant la santé humaine, animale, et environnementale, cette démarche offre une perspective holistique nécessaire pour cerner les facteurs contribuant à la prévalence des BMR et concevoir des stratégies de prévention adaptées (fig. 1). La Réunion, avec ses spécificités géographiques et épidémiologiques, se positionne ainsi comme un terrain d'étude privilégié, favorisant le développement de mesures ciblées et efficaces contre la dynamique de l'antibiorésistance.



Figure 1. Infographie illustrant le caractère “One Health” de l’antibiorésistance - SDES

Cette approche permet ainsi d'appréhender la complexité des interactions entre les différents compartiments et de mieux cerner les déterminants de l'antibiorésistance. À l'échelle mondiale, la surveillance de l'antibiorésistance s'intensifie, mettant en lumière la nécessité d'une coordination internationale. Les travaux de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et de l'Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) soulignent l'importance de stratégies intégrées pour contrôler l'antibiorésistance.

## 6. Surveillance de l'Antibiorésistance à La Réunion : Impact des $\beta$ -lactamases et Carbapénémases dans les Filières Élevage

L'étude proposée à travers ce rapport, fait suite au projet ANTIBIODOM, orchestré par le Cirad entre 2019 et 2020 sur la consommation d'antibiotiques et la résistance bactérienne dans les élevages à la Réunion et Mayotte, inscrit également dans le plan Ecoantibio 2 du ministère de l'agriculture. Cette étude, dont l'objectif est d'évaluer l'évolution de la prévalence des BMR parmi les filières volailles, ruminants et lapins, a permis d'identifier des prévalences inquiétantes de portage de gènes de résistances par les BMR chez les animaux, en particulier pour les filières volailles, avec une prévalence de 21%, bovins lait avec une prévalence de 19% et porcs avec une prévalence de 19%. Bien qu'une diminution de la prévalence des BMR ait été observées depuis quelques années, les résultats de cette étude mettent en évidence la nécessité d'une surveillance continue et d'une compréhension approfondie des facteurs contribuant à la dissémination de l'antibiorésistance dans cet environnement spécifique [1].

Parmi ces bactéries résistantes figurent celles qui produisent des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) et des carbapénémases. Ces enzymes, générées par certaines bactéries, présentent une capacité étendue de résistance, altérant l'efficacité des antibiotiques de la classe des  $\beta$ -lactamines, tels que les pénicillines, les céphalosporines, et les carbapénèmes.

Les BLSE, dont la production est notable chez certaines entérobactéries, représentent une préoccupation majeure. En effet, ces enzymes ont la capacité de dégrader les antibiotiques  $\beta$ -lactamines, élargissant ainsi leur spectre d'action et limitant l'efficacité de plusieurs classes d'antibiotiques. Cette capacité de résistance accrue aggrave la complexité des traitements, nécessitant des approches alternatives et une surveillance constante [25].

Les carbapénémases, autre groupe d'enzymes, sont capables de dégrader les carbapénèmes, des antibiotiques considérés comme ultimes recours dans de nombreuses situations cliniques. Leur présence compromet sévèrement les options thérapeutiques disponibles, accentuant le défi croissant de traiter les infections bactériennes résistantes. Des études récentes mettent en évidence l'expansion préoccupante de ces enzymes, soulignant l'urgence d'approches novatrices pour contrer leur propagation [Macgowan]. Dans ce contexte, une compréhension approfondie des mécanismes moléculaires sous-jacents à la production de BLSE et de carbapénémases devient essentielle pour orienter les stratégies de prévention et de traitement. L'identification précoce de ces enzymes dans les souches bactériennes est d'une importance cruciale pour adapter les protocoles thérapeutiques et freiner la propagation de l'antibiorésistance [21],[6]. Dans le contexte de ce rapport, une attention particulière a été portée sur la recherche d'entérobactéries multirésistantes. Ainsi, les souches bactériennes principalement détectées comprennent des *Escherichia coli*, des *Klebsiella pneumoniae*, des *Enterobacter sp.*, et des *Citrobacter sp.*

## 7. Objectifs de l'étude

Dans l'objectif d'une étude approfondie des mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission de gènes de résistance, l'utilisation de technologie de séquençage de nouvelle génération (NGS) a été particulièrement bénéfique pour l'analyse rapide et précise des génomes bactériens. Cette technologie a ainsi permis de cartographier et d'identifier les gènes de résistance des populations bactériennes cibles et a permis de détecter la localisation plasmidique ou chromosomique de nos gènes d'intérêt. L'optimisation du protocole de la technique de séquençage MinION d'Oxford Nanopore a permis d'obtenir des lectures de longue taille (long reads), facilitant ainsi l'assemblage des génomes et la détection de mutations responsables de la résistance. Cette approche a non seulement permis d'identifier les gènes de résistance présents dans les échantillons, mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de transmission horizontale des gènes. Grâce à la génomique, il a été possible de suivre la dissémination des gènes de résistance dans les environnements étudiés, offrant ainsi des perspectives essentielles pour le développement de stratégies de lutte contre l'antibiorésistance.

L'étude de la résistance aux antibiotiques à La Réunion, menée dans le cadre du projet collaboratif entre l'équipe ASTRE du Cirad et plusieurs partenaires dont le CHU Felix Guyon, s'inscrit dans le contexte mondial où l'antibiorésistance représente un défi majeur pour la santé publique.

La première question abordée concerne l'état actuel de l'antibiorésistance à La Réunion, en mettant particulièrement l'accent sur les filières d'élevage. Cette analyse initiale a été basée sur une compilation exhaustive des données disponibles concernant l'usage des antibiotiques, ainsi que sur les recherches bibliographiques et sur les recherches précédemment menées par l'unité, afin d'avoir un état des lieux complet du sujet.

Par la suite, un plan d'échantillonnage stratégique a été élaboré, impliquant la sélection judicieuse d'élevages sentinelles issus de coopératives et d'éleveurs indépendants pour lesquels des prélèvements par pédichiffonettes ont été réalisés. Ces prélèvements ont été supervisés par l'équipe de l'UMR ASTRE en collaboration avec les vétérinaires privés, les refuges et le Groupement de Défense Sanitaire de la Réunion (GDS974). Des enquêtes sur les pratiques agricoles ont également été menées sur le terrain.

Les données collectées ont été soumises à une analyse approfondie en laboratoire, débutant par une primoculture des échantillons environnementaux et fécaux, suivie de l'isolement des colonies bactériennes résistantes. Une évaluation phénotypique des souches d'intérêt a été réalisée puis des antibiogrammes basés sur des tests de diffusion à disque ont été effectués afin de déterminer l'ampleur de la résistance de nos souches. Par la suite, l'ADN des isolats a été extrait et soumis à un

séquençage systématique, suivi d'une analyse des données génomiques dans le but de surveiller le co-portage de gènes de résistance aux antibiotiques sur des mêmes plasmides.

Ainsi, cette étude permet d'appréhender l'ampleur de l'antibiorésistance à La Réunion, en mettant particulièrement l'accent sur les filières d'élevage et les carnivores domestiques. En compilant de manière exhaustive les données disponibles sur l'utilisation des antibiotiques et en menant des enquêtes sur le terrain, nous avons dressé un état des lieux complet de la situation. Cette analyse initiale est cruciale pour comprendre les dynamiques de résistance dans cet environnement spécifique.

Les résultats obtenus ont révélé la présence de portage de gènes de résistance par les bactéries multirésistantes, en particulier dans les filières volailles, lapins (ajouter en fonction des résultats). Cette constatation souligne l'urgence d'agir pour prévenir la propagation de l'antibiorésistance dans ces populations animales, et par extension, dans la communauté humaine.

En adoptant une approche One Health, cette étude démontre la nécessité de considérer la santé humaine, animale et environnementale de manière intégrée pour mieux comprendre et prévenir la propagation des bactéries multirésistantes. Les interactions complexes entre ces différents compartiments soulignent l'importance d'une coordination étroite entre les professionnels de la santé, les chercheurs et les autorités sanitaires pour élaborer des stratégies efficaces de prévention et de gestion de l'antibiorésistance.

En alignant nos efforts avec les initiatives nationales telles que le plan Écoantibio 2, nous pouvons espérer renforcer nos capacités de lutte contre l'antibiorésistance à La Réunion. Cependant, il est crucial de souligner que cette étude n'est qu'une première étape dans un processus continu de surveillance et d'adaptation. Une collaboration continue entre les différents acteurs sera essentielle pour faire face à l'évolution de cette menace et assurer l'efficacité des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes.

## **Matériel et méthodes**

L'ensemble des activités de laboratoire se sont déroulées au laboratoire de bactériologie de niveau de biosécurité 2 du CIRAD de Saint-Denis (40 Chemin Grand Canal, Saint-Denis 97490, La Réunion) et au laboratoire de bactériologie du CHU Félix Guyon de Bellepierre, situé à Allée des Topazes, Saint-Denis 97400, La Réunion.

### **1. Recrutement de partenaires et plan d'échantillonnage**

Afin de mener les recherches du projet Ecoantibio 2, un travail collaboratif entre différents acteurs de terrain a été mis en place. Une prise de contact a ainsi été effectuée avec les coopératives et les éleveurs de l'île afin de présenter le projet dans l'objectif de recruter des partenaires. Les filières de volailles, de lapins et de bovins viande et lait ont ainsi été contactées. Une présentation vulgarisée du projet a été réalisée lors de réunions d'information avec les directions de coopératives d'éleveurs de l'île et les techniciens d'élevages.

Une fois le projet accepté, une sélection stratégique d'élevages en fonction des zones géographiques a été réalisée et des listes d'éleveurs nous ont été transmises par les coopératives. Un premier contact a été effectué par téléphone afin de coordonner une date de prélèvement. L'objectif était ainsi d'établir un réseau d'élevages sentinelles permettant une distribution

géographique englobant la quasi-totalité de l'île, dans l'objectif de réaliser une surveillance globale de l'antibiorésistance à l'échelle insulaire de la Réunion (Fig.2).

Ces démarches ont permis d'inclure la Coopérative des Producteurs de Lapins de la Réunion (CPLR), la coopérative d'éleveurs de volailles AVIPOLE, la coopérative d'éleveurs bovins viande de la réunion (SICAREVIA) ainsi que différents éleveurs indépendants de bovins, de caprins et de volailles dont les contacts ont été obtenus par le biais des techniciens du Groupement de Défense Sanitaire de la Réunion (GDS Réunion).

À travers ce dispositif de surveillance, l'objectif est de réaliser sur deux années consécutives, 40 échantillonnages pour les volailles, 60 pour les porcs, 300 pour les ruminants comprenant bovins viandes, bovins lait et petits ruminants (ovins, caprins), 300 échantillons pour les lapins et 320 échantillons pour les carnivores domestiques, errants et divagants (chiens, chats) dans l'objectif d'isoler une trentaine de souches minimum par filière. Ces estimations se sont notamment basées sur les prévalences observées dans le cadre du projet ANTIBIODOM entre 2019 et 2021.

Dans le cadre de ce stage de recherche de 5 mois, 36 échantillons de volailles, 5 échantillons de bovins viandes et 14 échantillons de lapins ont été récupérés.

## **2. Échantillonnages et prélèvements**

Afin de réaliser les prélèvements, nous avons été amenés à nous déplacer sur l'intégralité de l'île en fonction des élevages faisant partie du réseau sentinelle établi.

Un deuxième échantillonnage a pu être réalisé dans ces mêmes élevages entre deux vides sanitaires, correspondant à une mise en place d'un lot (Mep), afin d'identifier une persistance des bactéries d'intérêt tout en faisant un lien avec les pratiques sanitaires et les normes mises en place par les coopératives.

### **2. a) Prélèvements volailles et bovins**

Concernant la collecte d'échantillons pour les volailles, les prélèvements ont été réalisés à l'aide de kit de pédichiffonettes SodiBox comprenant 2 pédichiffonettes et une paire de gants jetables. Avant tout prélèvement, une combinaison complète de protection, bleue pour les volailles afin de limiter le stress des animaux, ainsi que des surchaussures jetables ont été portées. Le prélèvement consiste ensuite à un aller-retour sur la longueur complète d'un bâtiment ou d'une étable pendant au minimum 4 minutes, pour garantir une collecte adéquate de matières fécales (fumier/lisier) non sélectives à un animal.

### **2. b) Prélèvements lapins**

Concernant les lapins, les prélèvements ont été réalisés par les techniciens de la CPLR à l'aide de pots de prélèvements fournis par le Cirad. En effet, sur la période de prélèvement, une épidémie de RHDV (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus) a engendré une limitation des visites dans les élevages afin d'éviter la propagation du virus. Les prélèvements ont ainsi été réalisés dans la fosse à lisier après curage journalier afin d'obtenir un prélèvement non sélectif.

Les bâtiments, les noms d'éleveurs ainsi que la date de chaque prélèvement ont été inscrits pour chaque échantillon. Chaque prélèvement a été réalisé en respectant les normes et les protocoles

sanitaires des élevages indiqués par les coopératives afin de minimiser les risques de contamination d'un élevage à l'autre.

Chaque échantillon a ensuite été conservé dans une glacière pour éviter toute détérioration en attendant d'être traité et enrichi au laboratoire le soir même.

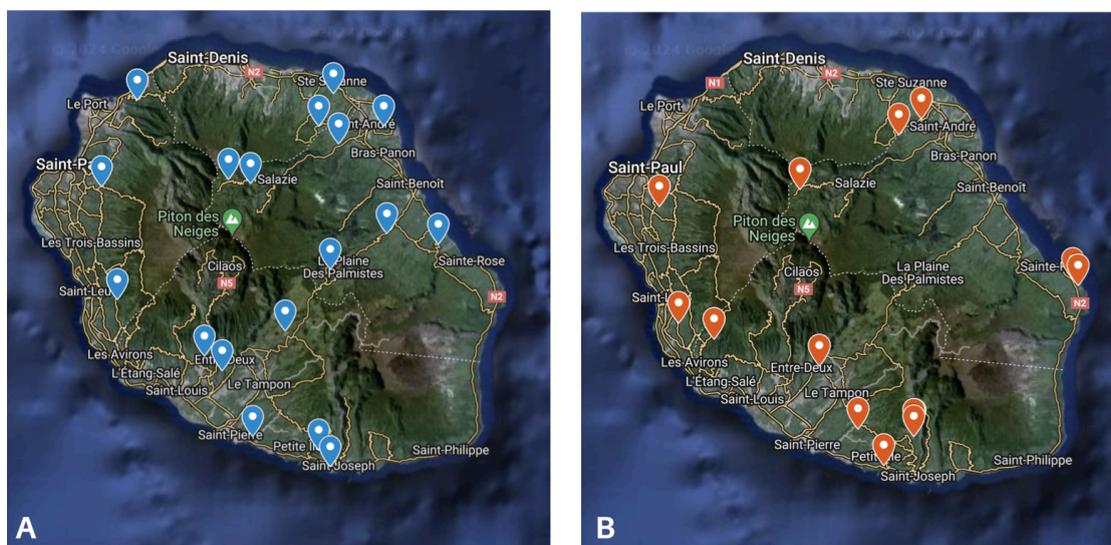


Figure 2. Répartition géographique des 18 élevages de volailles (Avipole) (A) et des 14 élevages de lapins (CPLR) (B) sur l'île de la Réunion - cartes réalisées sur "Google my map"

### 3. Enrichissement des prélèvements

#### 3. a) Prélèvements volailles et bovins

Une fois les échantillons prélevés, un enrichissement a été réalisé le jour même avec 100 mL d'eau peptonée par pédichiffonnettes soit 200 mL par échantillon. Les prélèvements enrichis ont par la suite été mis dans un incubateur à 37°C pendant 24h.

Cet enrichissement a été réalisé dans l'objectif de fournir les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne favorisant ainsi la prolifération des bactéries et permettant une meilleure détection des bactéries pathogènes ou résistantes présentes dans les matières fécales des animaux.

#### 3. b) Prélèvements lapins

Concernant les échantillons issus des élevages de lapins, 2 protocoles différents ont été testés afin d'identifier le protocole nous permettant une meilleure visualisation des bactéries résistantes d'intérêt. Ainsi dans un premier temps, 4g de matière fécale ont été prélevées par pot avant d'être enrichi avec 100 mL d'eau peptonée puis placés à 37°C pendant 24h.

En parallèle, des écouvillons stériles ont directement été plongés dans les pots de prélèvements afin de procéder directement à une mise en culture sans enrichissement. À l'issue de ces tests, la méthode d'enrichissement a été retenue afin de traiter les prélèvements de lapins.

### 4. Mise en culture des prélèvements

Après 24h d'incubation, chaque échantillon est ensemencé sur deux milieux sélectifs chromogènes pour favoriser la croissance sélective des bactéries soupçonnées de résistance aux antibiotiques :

- La gélose ChromID® BLSE, contenant un assortiment d'antibiotiques dont le Cefpodoxime, permettant la croissance et l'identification présumée des espèces bactériennes suspectées de résistance aux Bêta-Lactamines (Biomérieux, France, n.d.).
- La gélose ChromID® CARBA, contenant également un assortiment d'antibiotiques pour la croissance sélective et l'identification présumée des espèces bactériennes suspectes de résistance aux Carbapénèmes (Biomérieux, France, n.d.).

Ces milieux de culture chromogènes permettent une identification présumée basée sur la coloration du substrat chromogène en présence d'activités enzymatiques bactériennes ( $\beta$ -glucuronidase et  $\beta$ -galactosidase pour *E. coli*, coloré en rose/bordeaux ;  $\beta$ -glucosidase pour les bactéries *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, colorées en bleu/vert) (Biomérieux, France, n.d.).

Les boîtes ensemencées sont incubées pendant 24 heures à 37°C en conditions aérobies. Une présélection des colonies est réalisée en fonction de critères morphologiques basés sur la couleur des colonies, leur taille et leur aspect. En cas d'apparition de colonies incolores, un test d'oxydase est effectué conformément aux recommandations du fabricant pour distinguer les souches potentielles d'entérobactéries sans activité  $\beta$ -glucuronidase. Les colonies colorées sont ensuite repiquées pour purification sur un nouveau milieu identique dans les mêmes conditions d'incubation.

Enfin, une fois isolées, les souches colorées et les incolores négatives au test d'oxydase sont collectées et conservées en cryotubes dans 1 mL d'une solution de conservation glycérol-peptone, stockées à -18°C en vue de la seconde phase des analyses microbiologiques. Chaque échantillon s'est vu attribué un identifiant unique en fonction de sa provenance sous forme "V/LX-MepX-BLSE/CARBAX" avec "V" correspondant aux échantillons issus d'élevage de volailles et "L" de lapins, "Mep" correspondant à la mise en place d'un lot d'animaux entre deux vides sanitaires, et "BLSE" (Bêta-Lactamases à Spectre Élargi) ou "CARBA" (Carbapénémases) en fonction de la nature de la résistance de la bactérie stockée; "X" correspond à un numéro unique attribué.

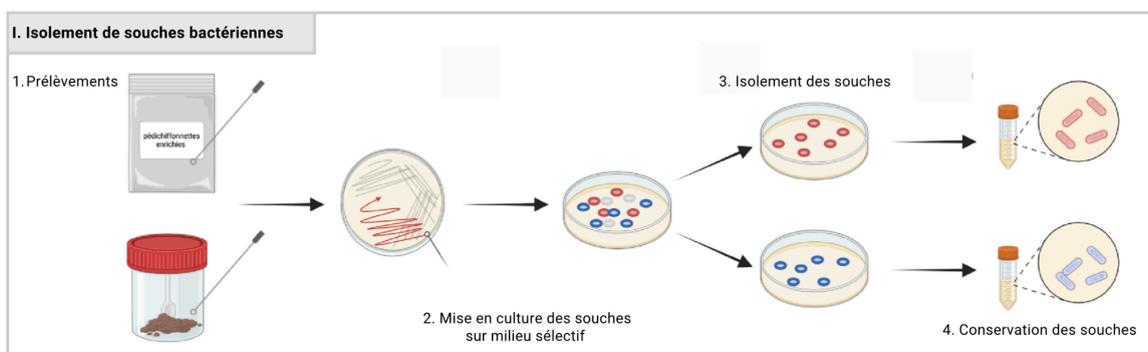


Figure 3. Schéma récapitulatif des étapes de culture et d'isolement des souches suspectes de résistance - (C. Robert, Biorender)

## 5. Identification des espèces bactériennes

Pour l'identification des espèces bactériennes, nous avons utilisé la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) au sein du CHU Félix Guyon de Bellepierre. Avant l'analyse, les isolats bactériens ont été repiqués à partir des stocks sur les milieux de culture sélectifs BLSE et CARBA afin d'éviter les contaminations croisées, puis ont été incubés pendant 24h à 37°C avant l'identification. À partir de ces repiquages, les colonies bactériennes ont été étalées sous forme de dépôts individuels en couches minces sur une plaque métallique avant l'ajout d'une matrice  $\alpha$ -CHCA (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique), permettant d'absorber l'énergie provenant du laser et de provoquer la vaporisation de l'échantillon avec la formation d'ions de masses différentes. En effet, la cristallisation obtenue était ainsi homogène et a permis une utilisation automatique des acquisitions par le spectromètre en offrant une bonne qualité de spectres. Ainsi, les spectres obtenus pour chaque bactérie ont été comparés à la base de données du CHU pour identifier le genre et l'espèce. Ce processus rapide et précis a ainsi permis d'obtenir des résultats fiables en quelques minutes, facilitant ainsi la sélection des souches pour les analyses ultérieures. Seules les bactéries appartenant aux espèces *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.* et *Citrobacter spp.* ont été sélectionnées pour la suite de nos analyses.

## 6. Réalisation d'antibiogrammes

Après l'identification des souches bactériennes par spectrométrie de masse, des antibiogrammes ont été réalisés par diffusion de disques d'antibiotiques, suivant les recommandations de l'EUCAST (Comité Européen de l'Antibiogramme).

Les souches ont, dans un premier temps, été prélevées à partir de cultures pures et suspendues dans un milieu de dilution standardisé. Ensuite, l'inoculum ainsi préparé a été réparti uniformément sur la surface d'une gélose nutritive Mueller Hinton de sorte à obtenir un tapis bactérien. Par la suite, 16 disques contenant différents antibiotiques ont été placés à la surface de la gélose à l'aide d'un applicateur. Les 16 antibiotiques sélectionnés (Tab.1) ont été choisis pour assurer une comparabilité maximale avec les études antérieures menées sur l'île de la Réunion, conformément aux recommandations de l'EARS Vet (Mader et al., 2022), tout en optimisant la capacité de test de ces disques sur gélose (Biomérieux, France, n.d.).

Antibiotiques testés, abréviations et diamètres critiques

Catégorie	Abréviations	ATB	Diamètres critiques (EUCAST 2019)
Aminopenicilline	AMP 10	Ampicilline	S $\geq$ 14 / R < 14
	AMO 20	Amoxicilline	S $\geq$ 19 / R < 19
	AMC 30	Amoxicilline / acide clavulanique	S $\geq$ 19 / R < 19
Carboxypenicilline	TIC 75	Ticarcelline	S $\geq$ 23 / R < 20
Cephalosporine de 1 <sup>e</sup> génération (C1G)	COX 5	Céfotaxime	S $\geq$ 20 / R < 17
C2G	CZD 10	Ceftazidime	S $\geq$ 22 / R < 19
C4G	FEP 30	Céfépime	S $\geq$ 27 / R < 21
Carbapénème	IPM 10	Imipénème	S $\geq$ 22 / R < 16
	ETP 10	Ertapénème	S $\geq$ 25 / R < 22
Polymixine	COL 10	Colistine	S $\geq$ 18 / R < 15
Aminoglycoside	GMN 10	Gentamicine	S $\geq$ 17 / R < 14
Tétracycline	TET 30	Tétracycline	S $\geq$ 18 / R < 15
Fluoroquinolone	CIP 5	Ciprofloxacine	S $\geq$ 26 / R < 24
	OFX 5	Ofloxacine	S $\geq$ 24 / R < 22
Glycylcycline	TGC 15	Tygécycline	S $\geq$ 18 / R < 15
Sulfamide	SXT 25	Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole	S $\geq$ 14 / R < 11

Tableau 1. Liste des antibiotiques testés et des dimètres critiques (EUCAST,2019)

Les plaques ont été incubées à 37°C pendant une période de 24h. Après l'incubation, le diamètre d'inhibition autour de chaque disque a été mesuré manuellement puis comparé aux critères de sensibilité définis par l'EUCAST pour chaque antibiotique testé. Les résultats ont été interprétés selon les normes établies par l'EUCAST pour déterminer la sensibilité ou la résistance de la souche à chaque antibiotique. En parallèle, l'activité des BLSE a été évaluée par observation d'une image de synergie dite en "bouchon de champagne" entre un disque d'amoxicilline/acide clavulanique et une céphalosporine de 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> génération. De même, l'activité carbapénémase (EPC) a été suspectée en cas de diminution de la sensibilité à un carbapénème. En suivant ce protocole, nous avons pu évaluer la sensibilité des souches bactériennes testées à une gamme d'antibiotiques pertinente pour la détection des activités BLSE et EPC, conformément aux recommandations internationales.

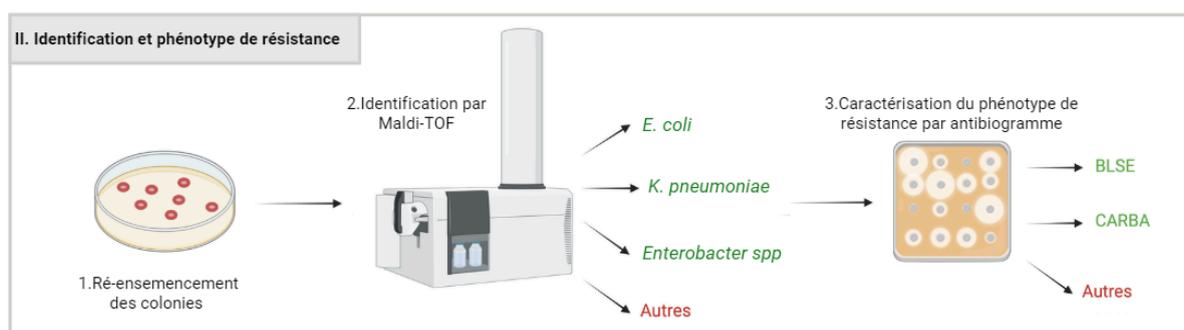


Figure 4. Schéma récapitulatif des étapes d'identification et de caractérisation des phénotypes- (C. Robert, Biorender)

## 7. Analyses moléculaires

Dans le cadre de ce stage, l'objectif a été d'optimiser le protocole de la technologie Nanopore dans le cadre des analyses moléculaires de nos souches d'intérêt. Cette méthode de séquençage d'ADN s'est avérée particulièrement pertinente afin d'identifier et de caractériser les gènes de résistances des entérobactéries isolées, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.* et *Citrobacter spp.*

La technologie Nanopore a ainsi présenté des avantages significatifs par sa simplicité d'utilisation et sa rapidité de mise en œuvre permettant la réalisation efficace de séquençages nécessaires à l'étude de l'activité BLSE et CARBA au sein des souches bactériennes.

Le fonctionnement de cette technologie repose sur la lecture simultanée de multiples brins d'ADN, à partir d'un certain nombre de pores actifs, plus ou moins grand, dans la membrane (flow-cell) utilisée. Cette approche permet par ailleurs la lecture de fragments d'ADN de grande taille, appelés "long reads", simplifiant ainsi le processus de reconstruction des séquences contrairement au séquençage Illumina, qui ne permet que la lecture de fragments de petite taille,

appelés “short reads”. Cette capacité est particulièrement bénéfique dans le contexte de l’étude de la résistance aux AMR, car elle facilite la détermination de l’origine génétique des gènes identifiés, en déterminant s’ils sont portés par un plasmide ou le chromosome. En analysant ces données, il devient possible de mieux comprendre les mécanismes de transmission génétique et les caractéristiques clonales des souches bactériennes étudiées. En plus d’être rapide et efficace, il permet d’obtenir des séquences à moindre coût.

### **7. a) Extraction d’ADN**

Plusieurs séries de séquençage ont été réalisées au cours de ce stage afin de caractériser phénotypiquement les souches isolées.

Pour pouvoir effectuer ces séquençages, des extractions d’ADN ont été réalisées à l’aide du kit QIAamp DNA Mini-Kit (QIAGEN), après une remise en culture des souches isolées sur un milieu nutritif McConkey, non sélectif.

Une fois l’extraction réalisée, un dosage de l’ADN a été effectué par quantification fluorimétrique Qubit (Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer, USA) dont le principe repose sur l’ajout d’un fluorochrome se liant de manière sélective à l’ADN, générant ainsi un signal fluorescent proportionnel à la concentration de ces molécules dans l’échantillon.

La concentration-cible visée pour ces extractions était d’un minimum de 22 ng/μl afin d’obtenir suffisamment de matériel génétique et assurer la bonne exécution du séquençage MinION selon les recommandations et l’optimisation des protocoles Nanopore.

Après l’extraction, l’ADN est dilué à une concentration de 22 ng/μl. La librairie de séquençage est préparée selon les protocoles spécifiques d’Oxford Nanopore Technologies. En utilisant les enzymes de type « transposase » fournies dans le « kit de barcoding rapide », une petite séquence connue d’ADN (« barcode ») est insérée dans l’ADN génomique de chaque bactérie à séquencer. L’introduction du barcode sert à fragmenter le génome de la bactérie et à insérer une séquence connue dans chaque molécule d’ADN à séquencer. Cette séquence sera ensuite utilisée pour distinguer les séquences provenant de différents génomes (un processus appelé « démultiplexage »). Après une courte période, les transposases sont inactivées par l’ajout d’EDTA. Les échantillons avec des barcodes différents sont mélangés et l’ADN mélangé est purifié.

L’étape de purification consiste à ajouter des microbilles magnétiques enrobées de silice à l’ADN extrait afin de lier spécifiquement les acides nucléiques en présence d’un tampon à haute concentration en sel et en éthanol. Cette liaison permet la capture sélective de l’ADN et la séparation des impuretés.

Par la suite, le mélange microbilles-ADN est soumis à une série de lavages. Les microbilles, avec l’ADN fixé, sont maintenues en place à l’aide d’un aimant, tandis que les solutions de lavage sont ajoutées pour éliminer les contaminants résiduels tels que les protéines, les lipides et les sels. Deux à trois cycles de lavage sont effectués en utilisant un tampon de lavage, suivis d’une étape de centrifugation pour assurer l’élimination complète des surnageants de lavage.

Après les lavages, l’ADN purifié est libéré des microbilles par l’ajout d’un tampon d’élution de type Tris-EDTA, de faible force ionique, et par incubation du mélange à température ambiante pendant quelques minutes.

La librairie de séquençage est finalisée par l'ajout des « adaptateurs », molécules protéiques qui permettent la dénaturation de l'ADN pour que les brins simples d'ADN puissent passer à travers les pores d'une « flowcell » MinION.

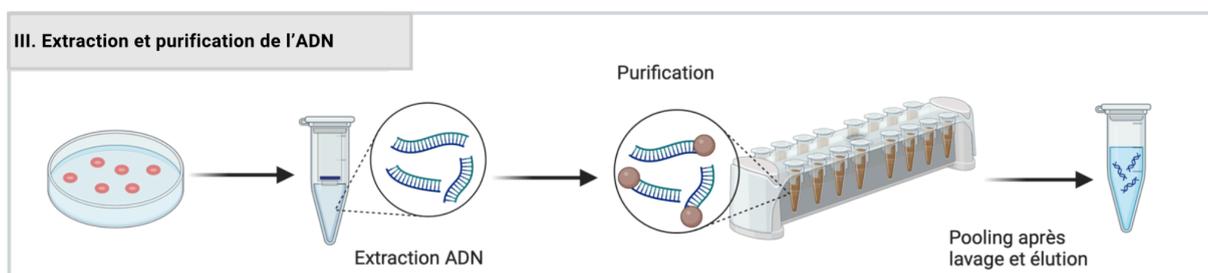


Figure 5. Schéma récapitulatif des étapes d'extraction et de purification de l'ADN des souches d'intérêt (C. Robert, Biorender)

### 7. b) Séquençage MinION Oxford Nanopore

L'ensemble des génomes bactériens obtenus ont été séquencés par la technologie MinION Nanopore (Oxford Nanopore Technology V14) avec le kit de barcoding rapide (Rapid Barcoding Kit SDK-RBK 114.94). Le séquençage a été réalisé avec une flowcell R10.4.1 sur le séquenceur MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technology V14).

Avant le chargement de la librairie d'ADN, le flow cell du MinION a été préparé conformément aux instructions d'Oxford Nanopore Technologies. Cette préparation a inclus le préconditionnement du flow cell par un rinçage avec une solution de conditionnement, "Priming Solution", fournie par le fabricant. Ce processus a ainsi permis d'optimiser les performances des nanopores et de garantir des conditions optimales pour le séquençage.

Un tampon de chargement a ensuite été ajouté à la librairie pour stabiliser l'ADN et faciliter son entrée dans les nanopores. Le volume et la concentration de l'ADN chargés ont été soigneusement ajustés pour maximiser le nombre de molécules d'ADN qui entrent en contact avec les nanopores sans saturer le flow cell.

La librairie d'ADN a été introduite dans le flow cell par le biais du port de chargement. Cette étape a été réalisée avec précaution pour éviter la formation de bulles d'air et assurer une distribution homogène de la librairie sur la surface du flow cell.

Une fois la librairie chargée, le séquençage a été initié en utilisant le logiciel MinKNOW, qui contrôle et surveille le dispositif MinION. Le séquençage par nanopores s'est déroulé en temps réel sur 3 jours jusqu'à épuisement du flowcell.

Les signaux électriques bruts générés par le passage de l'ADN à travers les nanopores sont ensuite convertis en séquences de bases par des algorithmes de traitement de données appelés "basecallers" et un démultiplexage des données est réalisé par le logiciel Dorado version 0.5.3 sous le modèle "super accurate", modèle offrant la plus grande précision. Le logiciel a ainsi permis de traduire les variations de courant en séquences de nucléotides, produisant ainsi des lectures continues de l'ADN. L'assemblage de novo des génomes à partir de données de séquences "long reads" obtenus a ensuite été réalisé par le logiciel Flye assembler version 2.9.4. Une étape de filtrage des données brutes de mauvaise qualité a également été réalisée en utilisant le logiciel Filtrlong version 0.2.1.

Le logiciel Medaka version 1.11.3 a par la suite été utilisé afin de corriger des erreurs de

séquences et permettre une amélioration de la qualité des assemblages permettant ainsi d'obtenir un séquençage précis et fiable.

## **8. Analyses Bioinformatiques**

### **8. a) Contrôle de la qualité des données génomiques**

Dans un premier temps, un contrôle de la qualité des données génomiques générées a été réalisé à l'aide de différents outils. La première étape a consisté à évaluer la qualité et la continuité des assemblages génomiques en termes du nombre de contigs et de la valeur N50, correspondant à la taille d'un contig dont 50% des bases de l'assemblage sont comprises dans des contigs de taille supérieur à cette taille. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel SeqKit à partir du logiciel R, qui nous a permis de quantifier ces métriques, offrant ainsi une première indication de la continuité et de la robustesse des assemblages de séquences. Ensuite, nous avons évalué la quantité de données disponibles en examinant la profondeur de lecture pour chaque contig, en important les résultats du logiciel Medaka. Cette étape s'est avérée cruciale pour s'assurer que la couverture de séquençage était suffisante pour une analyse fiable et précise des génomes. Enfin, nous avons identifié les "core genes" en utilisant le logiciel BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs), qui compare nos séquences à une base de données d'orthologues universels pour déterminer s'ils sont complets et la qualité de nos génomes assemblés.

### **8. b) Description des bactéries séquencées**

Dans un second temps, une description des bactéries séquencées a impliqué plusieurs étapes d'identification et de caractérisation. Pour chaque génome, nous avons identifié l'espèce la plus probable en utilisant le logiciel GAMBIT, qui compare les séquences génomiques à des bases de données de référence pour fournir une classification taxonomique précise. Ensuite, nous avons attribué un profil de typage MLST (Multilocus Sequence Typing) à chaque génome en utilisant le logiciel MLST, ce qui nous a permis de classifier les souches bactériennes en fonction de leurs séquences alléliques sur plusieurs loci. Pour distinguer les contigs chromosomiques des plasmidiques, nous avons employé le logiciel MOB-Recon, spécialisé dans l'identification et la caractérisation des plasmides. Enfin, pour déterminer la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans chaque génome, nous avons utilisé le logiciel AMRFinder, qui compare les séquences à une base de données de gènes de résistance connus, fournissant ainsi des informations critiques sur les capacités de résistance des bactéries analysées.

### **8. c) Comparaison de la similarité des génomes**

La comparaison de la similarité des génomes a été réalisée par deux analyses complémentaires. Premièrement, nous avons effectué une analyse de l'identité nucléotidique moyenne (Average Nucleotide Identity, ANI) en utilisant le logiciel FastANI. Cette méthode permet de comparer les séquences génomiques pour déterminer la similarité globale entre les génomes, offrant une mesure quantitative de leur proximité évolutive. Deuxièmement, nous avons conduit des analyses de polymorphisme de nucléotides (Single Nucleotide Polymorphism,

SNP) pour identifier les variations ponctuelles entre les génomes. Cette analyse fine nous permet de détecter des différences génétiques subtiles et d'inférer des relations phylogénétiques précises entre les souches bactériennes séquencées. L'ensemble de ces analyses nous ont ainsi permis de fournir une vue d'ensemble détaillée de la similarité génomique et des relations évolutives des bactéries étudiées.

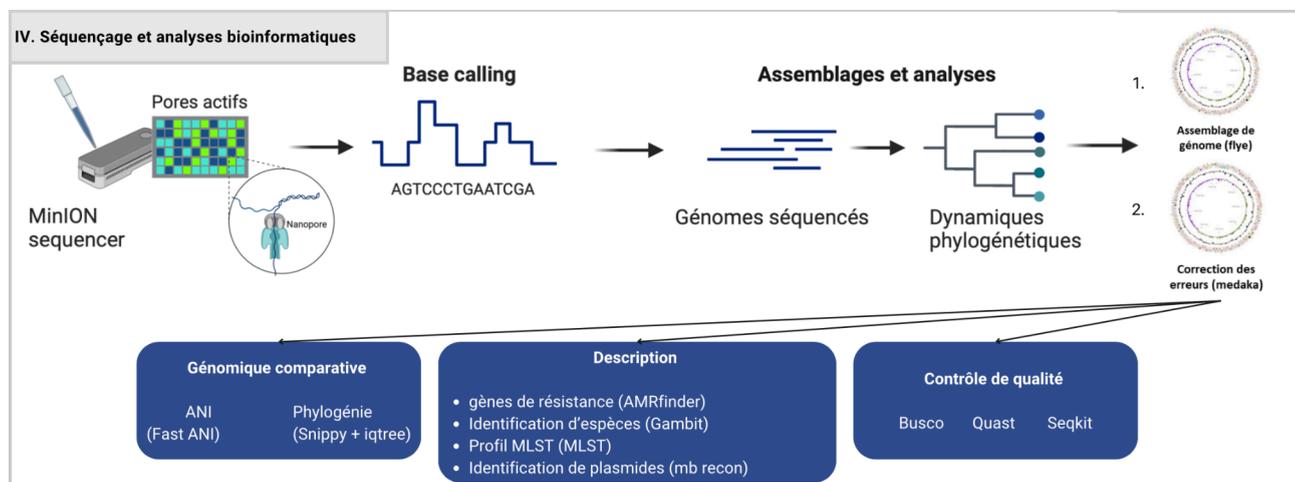


Figure 6. Schéma récapitulatif des étapes de séquençage et d'analyses bioinformatiques (C. Robert, Biorender)

## Résultats

### 1. Échantillonnages et prélèvements

Pendant la durée de ce stage de recherche, nous avons récupéré et analysé 36 échantillons de volailles, 5 échantillons de bovins viande, et 28 échantillons de lapins au laboratoire de sécurité de niveau 2 du Cirad à Saint Denis. Parmi les 28 échantillons de lapins, seulement 14 étaient exploitables en raison d'un retard dans leur réception et d'un mauvais conditionnement.

Concernant les échantillons de volailles, sur l'ensemble des échantillons traités, 3 bactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines (BLSE) ont pu être isolées. 2 bactéries résistantes identiques à celles retrouvées lors de la première mise en place (Mep1) ont été isolées à l'issue de la seconde mise en place (Mep2). Au total, cinq isolats ont été analysés, représentant 8,3 % d'élevages positifs sur l'ensemble des élevages de volailles visités.

Concernant les élevages de lapins, 3 bactéries résistantes BLSE ont été isolées représentant 21,4% d'élevages positifs.

Concernant la filière bovine viande, 2 bactéries BLSE ont été isolées sur 5 échantillons, représentant 40% d'élevages positifs. Le nombre d'échantillons n'est cependant pas assez important pour être représentatif de la filière bovine viande.

Bien que ces données fournissent un aperçu de l'état actuel de l'antibiorésistance dans ces filières, elles ne peuvent pas être considérées comme des prévalences en raison du nombre insuffisant d'échantillons, l'objectif principale de ce stage étant la description génomique des souches de BLSES et ECPs en circulation dans différents élevages à La Réunion.

De plus, aucune bactérie résistante aux carbapénèmes n'a été identifiée lors de ces sessions d'échantillonnage.

## 2. Identification des espèces bactériennes

Suite à 2 sessions de MALDI-TOF, réalisées au CHU Félix Guyon, une première identification des espèces bactériennes isolées a été réalisée. Ces identifications étaient notamment basées sur les scores de certitudes en quantifiant la confiance dans le résultat de l'identification. Des scores élevés indiquaient ainsi une plus grande confiance dans la classification.

L'identification finale et le score de certitude sont rapportés, indiquant dans quelle mesure l'échantillon correspond à une espèce ou un genre particulier dans la base de données.

Les bactéries issues des échantillons L01, L03, L11, V237.1 et V237.2 ont été identifiées en tant que *Escherichia coli*. Les bactéries issues des échantillons BV1, BV2 et V303 ont été identifiées en tant que *Enterobacter cloacae*. Pour finir, les souches issues des échantillons V281.1 et V281.2 ont été identifiées en tant que *Klebsiella pneumoniae*.

Ces résultats montrent une distribution de 50 % d'*Escherichia coli*, 12,5 % de *Klebsiella pneumoniae* et 37,5 % d'*Enterobacter cloacae* parmi les bactéries identifiées. Dans une étude plus large comprenant l'ensemble des bactéries isolées sur les trois compartiments en 2024 à La Réunion et à Mayotte (soit 37 souches isolées), la majorité des souches ont été identifiées comme *E. coli*, représentant 78,3 % des souches isolées tous compartiments confondus bien qu'il existe une grande diversité de bactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines.

## 3. Analyses de la qualité des séquençage (Seqkit)

Le génome de chaque bactéries isolées a été séquençé par la technologie MinION Oxford Nanopore. Une analyse Seqkit a été réalisée pour chaque séquençage afin de vérifier la qualité des assemblages de nos génomes en analysant des métriques clés telles que le nombre de séquences, la longueur totale, la longueur moyenne, le N50 et le pourcentage de GC (Tab.2).

Tableau récapitulatif des résultats Seqkit

ID	type	Nombres de séquences	Longueur totale du génome	Taille de la plus petite séquence	Taille moyennes des séquences	Taille de la plus grande séquence	N50	%GC
BV1_BLSE	DNA	2	4,745,081	3,221	2,372,540.5	4,741,860	4,741,860	55,63
BV2_BLSE	DNA	1	4,741,837	4,741,837	4,741,837	4,741,837	4,741,837	55,63
L01_Mep1_BLSE1	DNA	4	5,030,114	12,456	1,257,528.5	4,887,559	4,887,559	50,74
L03_Mep1_BLSE1	DNA	4	4,709,368	4,507	1,177,342	4,613,210	4,613,210	50,88
L11_Mep1_BLSE1	DNA	4	4,709,371	4,510	1,177,342.8	4,613,210	4,613,210	50,88
V237_Mep1_BLSE1	DNA	5	5,754,069	2,312	1,150,813.8	5,576,611	5,576,611	50,48
V237_Mep2_BLSE1	DNA	9	5,780,411	516	642,267.9	5,579,257	5,579,257	50,47
V281_Mep1_BLSE2	DNA	2	5,326,921	203,866	2,663,460.5	5,123,055	5,123,055	57,36
V281_Mep2_BLSE1	DNA	2	5,326,912	203,864	2,663,456	5,123,048	5,123,048	57,36
V303_mep1_BLSE3	DNA	5	4,786,584	3,774	957,316.8	3,155,272	3,155,272	55,14

Tableau 2. Tableau récapitulatif de l'analyse de la qualité du séquençage des 10 souches E-BLSE.

Le nombre de séquences varie de 1 à 9 pour les échantillons, ce qui peut indiquer différents niveaux de fragmentation dans les assemblages génomiques. Ainsi, les assemblages des échantillons BV1, BV2, V281.1 et V281.2, présentent un faible nombre de contigs (compris entre 1 et 2) indiquant un assemblage contigu du génome chromosomique principal.

Une fragmentation plus importante, comme observée pour les autres échantillons, peut résulter de la présence de régions répétitives dans le génome ou de la présence de plasmides.

La longueur totale des séquences varie entre environ 4,7 Mb et 5,8 Mb, ce qui est typique pour des génomes bactériens.

Les valeurs de longueur totale observées sont cohérentes avec la taille attendue pour des génomes d'*Enterobacteriaceae* (4,5 Mb à 5,5 Mb), d'*Escherichia coli* (4,5 Mb à 5,5 Mb) et de *Klebsiella* (5 Mb à 6 Mb). Une longueur totale cohérente entre les échantillons indique une couverture adéquate et une extraction d'ADN efficace.

La longueur moyenne des séquences dépend du nombre total de séquences dans chaque échantillon. Ainsi les échantillons avec un nombre élevé de séquences (par exemple, V237.2 avec 9 séquences) montrent une longueur moyenne plus petite (642,267.9 bases), ce qui est attendu en raison de la fragmentation du génome.

Les échantillons avec peu de séquences (par exemple, BV2 avec 1 séquence) montrent une longueur moyenne élevée (4,741,837 bases), ce qui est également attendu et indique une meilleure contiguïté.

Des valeurs plus faibles (par exemple, 516 bases pour V237.2) peuvent indiquer des séquences courtes résultant de la fragmentation ou de la présence de plasmides.

Des valeurs élevées (par exemple, 5,579,257 bases pour V237.2) suggèrent la présence de contigs presque complets ou complets.

Le N50 permet la mesure de la qualité de l'assemblage, indiquant la longueur de la plus petite contig pour laquelle la somme des contigs plus longs représente au moins 50% de la longueur totale de l'assemblage :

Des valeurs de N50 élevées (par exemple, 5,579,257 pour V237.2) indiquent un assemblage de haute qualité pour le génome chromosomique.

Des valeurs de N50 plus faibles (par exemple, 3,155,272 pour V303) suggèrent une fragmentation de génome en 2 par la présence de plasmide.

Le pourcentage de GC est une caractéristique variant d'une espèce à l'autre, permettant de caractériser les génomes bactériens.

Les valeurs de pourcentage de GC varient de 50,47% à 57,36%. Les échantillons BV1, BV2 et V303 possèdent respectivement des pourcentages de GC de 55,63%, 55,63% et 55,14%. Ces pourcentages sont cohérents avec les valeurs attendues pour les génomes d'*Enterobacteriaceae*, ce qui correspond à l'espèce identifiée pour ces échantillons. Les échantillons L01, L03, L11 et V237.1 et V237.2 possèdent des pourcentages de GC compris entre 50,47% et 50,88%. Ces pourcentages sont cohérents avec les valeurs attendues pour les génomes d'*E.coli* ce qui correspond à l'espèce identifiée pour ces échantillons. Pour finir, les échantillons V281.1 et V281.2 présentent un pourcentage de 57,26%, caractéristique des *Klebsiella*. La cohérence de ces valeurs à travers les échantillons indique que les séquences sont représentatives de l'organisme et qu'il n'y a pas de contamination significative par d'autres organismes avec des contenus GC très différents.

Les résultats montrent des séquences globalement de bonne qualité avec des tailles et des compositions en GC attendues. La présence de multiples contigs courts dans certains échantillons suggère fortement la présence de plasmides.

#### 4. Description des bactéries identifiées et séquencées

##### a. Identification de l'espèce la plus probable (Gambit)

Afin de confirmer l'identification réalisée au MALDI TOF, une analyse Gambit a été effectuée afin d'identifier les espèces des souches étudiées à partir de la comparaison de leur génome à une base de données.

Suite à cette analyse, nous avons pu confirmer que les souches BV1 et BV2 étaient identifiées en tant que *Enterobacter cloacae*, les souches L01, L03, L11, V237.1 et V237.2 ont été identifiées en tant qu'*Escherichia coli*. Pour finir, les souches V281.1 et V281.2 ont été identifiées en tant que *Klebsiella pneumoniae*.

##### b. Attribution d'un profil mlst (Multi-Locus Sequence Typing)

Un typage multilocus MLST, méthode de typage moléculaire, a été réalisé pour chacune des souches dans l'objectif de caractériser les bactéries en fonction de leurs profil allélique (ST) déterminé à partir d'une combinaison de numéro associé aux allèles.

Pour les *Enterobacter cloacae*, les souches BV1 et BV2 ont été identifiées comme appartenant à ST51, avec des variants dans les locus *dnaA(4)*, *fusA(4)*, *gyrB(4)*, *leuS(6)*, *pyrG(37)*, *rplB(4)* et *rpoB(6)*. La souche V303 a été identifiée appartenant à ST614, avec des variants dans les locus *dnaA(201)*, *fusA(21)*, *gyrB(19)*, *leuS(44)*, *pyrG(45)*, *rplB(12)*, *rpoB(32)*.

Pour les *Escherichia coli*, une diversité de variants a pu être observée. Les souches L01, L03 et L11 ont été regroupées sous ST602 et ST10 respectivement, montrant des variations spécifiques dans les locus *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* et *recA*. Quant à V237 et V237, elles ont été associées à ST350, avec des variants dans *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* et *recA*.

Pour les *Klebsiella*, les résultats ont indiqué une similarité génétique avec les souches V281.1 et V281.2 partageant le même ST4083. Les variations observées dans les locus *gapA(2)*, *infB(5)*, *mdh(2)*, *pgi(1)*, *phoE(4)*, *rpoB(1)* et *tonB(4)* montrent une diversité génétique sous-jacente malgré leur apparente proximité phylogénétique.

Ces résultats soulignent une adaptation continue et une dispersion géographique des souches, influencées potentiellement par la pression sélective des antibiotiques.

## 5. Identification des gènes de résistance (AMRfinder)

Pour la suite de l'analyse des échantillons, une analyse bioinformatique des séquences a été réalisée par le logiciel AMRfinder.

Le logiciel a ainsi été utilisé pour analyser des séquences génomiques bactériennes dans l'objectif de détecter la présence de gènes connus qui confèrent une résistance à divers antimicrobiens, y compris les antibiotiques (Fig.7).

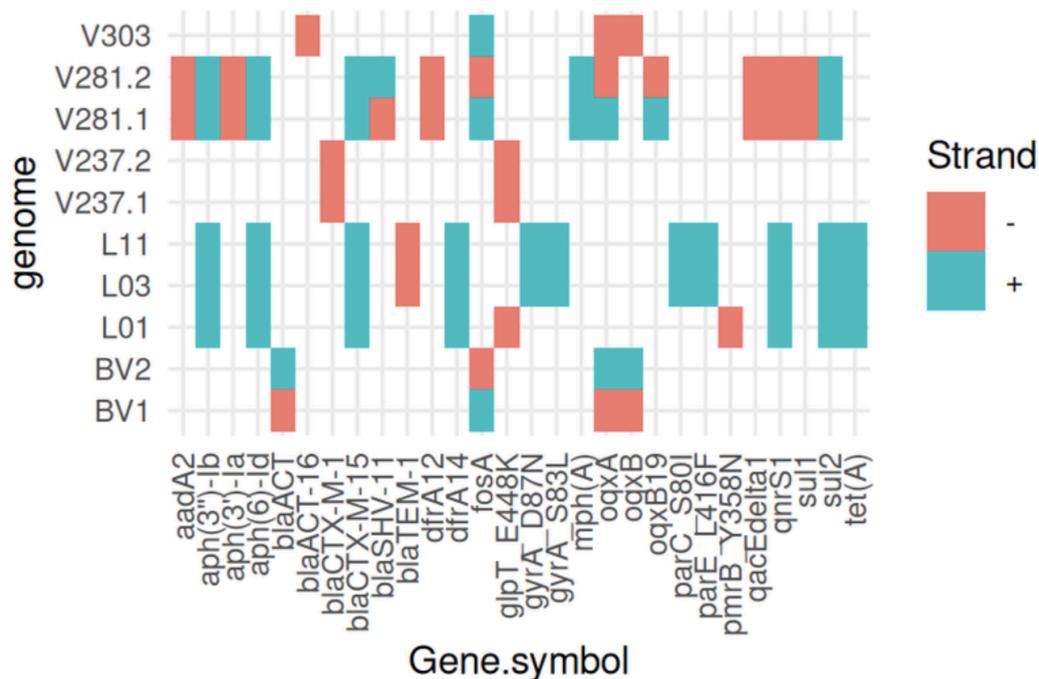


Fig.7. Graphique montrant la présence ou l'absence de gènes de résistance en fonction des différents génomes

Genome : ID des échantillons, gene.symbol : gènes de résistance identifiés sur l'ensemble des échantillons, strand: sens de lecture positif (+) ou négatif (-) des gènes dans le génome.

### Diversité des Gènes de Résistance :

Les gènes de résistance identifiés incluent des gènes codant pour des enzymes modifiant les antibiotiques (*aadA2*, *aph(3'')-Ib*, etc.), des bêta-lactamases (*blaCTX-M-15*, *blaTEM-1*, etc.), et des gènes conférant une résistance à divers autres antibiotiques (*dfrA12*, *sul1*, *tet(A)*).

La diversité des gènes détectés montre une large gamme de mécanismes de résistance présents chez les entérobactéries étudiées, reflétant une pression sélective importante des antibiotiques dans l'environnement ou les hôtes humains.

### Distribution des Gènes par Génome :

Certains génomes, comme V281.1 et L11, montrent une présence importante de gènes de résistance, suggérant une forte intégration des éléments génétiques de résistance.

D'autres génomes, tels que BV1 et BV2 ou V237.1 et V237.2, montrent une distribution plus limitée des gènes de résistance, indiquant peut-être une moindre exposition aux antibiotiques ou des différences dans les mécanismes d'acquisition de gènes.

### Orientation des Gènes (Strand) :

Les bactéries peuvent avoir plusieurs gènes de résistance localisés au même endroit du génome, ce qui suggère souvent un transfert horizontal de gènes via des éléments mobiles comme les plasmides, intégrons ou prophages. Elles utilisent également des « opérons » pour réguler l'expression de plusieurs gènes par un seul mécanisme, ces gènes étant généralement orientés dans la même direction. Les opérons permettent aux gènes liés par leur fonction d'être souvent regroupés dans le génome.

Certains gènes tels que *aph(3'')-Ib* et *aph(6)-Id* (inactivation des aminoglycosides par modification chimique) apparaissent de manière récurrente dans plusieurs génomes, ce qui peut indiquer une utilisation fréquente d'antibiotiques aminoglycosides dans les environnements où ces bactéries ont été isolées.

Ces données montrent ainsi une distribution hétérogène des gènes de résistance chez les entérobactéries séquencées, avec une prévalence notable de gènes conférant une résistance aux bêta-lactamines et d'autres classes d'antibiotiques. Cette diversité reflète l'adaptabilité des entérobactéries face aux pressions antibiotiques.

## 6. Analyse des antibiogrammes et lien avec les gènes de résistances identifiés

Des antibiogrammes ont été réalisés pour chacune des souches isolées afin d'identifier leur phénotypes de résistances dans l'objectif de les associer à la présence ou l'absence de gènes de résistances identifiés par analyses bioinformatiques suite au séquençage des souches. Les diamètres d'inhibition ont ainsi été mesurés puis on permit la réalisation d'une heatmap (Fig.8) représentant la sensibilité de 10 souches d'entérobactéries résistantes aux BLSE à 16 antibiotiques différents. La couleur varie du rouge (résistant) au blanc (sensible) et est basée sur les diamètres d'inhibition observés lors des antibiogrammes. En parallèle, le tableau 3 répertorie les gènes de résistance identifiés pour chaque bactérie. Cette analyse vise à établir des corrélations entre la présence de certains gènes de résistance et la résistance des bactéries à différentes classes d'antibiotiques.

Résistance aux  $\beta$ -lactamines:

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont révélé une résistance significative aux  $\beta$ -lactamines, incluant l'amoxicilline (AMO), la ticarcilline (TIC), l'amoxicilline-clavulanate (AMC), la ceftazidime (CAZ), l'ampicilline (AMP), et le cefepime (FEP), chez la plupart des isolats testés. Cette résistance est particulièrement marquée chez les souches BV1, BV2, V237.1, V237.2, V303, et V281.1.

En effet, les gènes tels que *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-15*, *blaACT-16*, *blaSHV-11*, et *blaTEM-1*, codent pour des bêta-lactamases à spectre élargi (ESBL). Ces enzymes hydrolysent les bêta-lactamines, rendant les bactéries résistantes à cette classe d'antibiotiques. Les isolats V237.1, V237.2, V303, BV1, BV2, L03, L11, L01, V281.1, et V281.2 montrent une forte résistance (zones rouges) à plusieurs bêta-lactamines (AMO, TIC, COX, AMC, CAZ, AMP, FEP). Cette résistance est cohérente avec la présence des gènes ESBL identifiés.

Résistance aux fluoroquinolones (CIP, OFX) :

Les souches L03, et L11 montrent une résistance aux fluoroquinolones.

Les gènes *gyrA\_D87N*, *gyrA\_S83L*, et *parC\_2801*, *parE\_L416F*, présents dans ces souches, codent pour des mutations dans les enzymes cibles des fluoroquinolones (ADN gyrase et topoisomérase IV), diminuant ainsi l'efficacité de ces antibiotiques. De plus, les gènes tels que *oqxA*, *oqxB*, et *qacEdelta1*, codent pour des pompes à efflux qui expulsent les antibiotiques hors de la cellule bactérienne, diminuant leur efficacité. Les isolats V303, BV1, BV2, L11, et L01 montrent une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, incluant les fluoroquinolones (OFX, CIP) et les sulfamides (SXT). Cette résistance est attribuée à l'activité des pompes à efflux codées par ces gènes.

Résistance aux aminoglycosides (GMN) :

Les souches L01, L03, et L11 montrent également une résistance aux aminoglycosides.

Les gènes comme *aph(3'')-Ib*, *aph(3'')-Id*, *aph(6)-Id*, et *aadA2*, codent pour des transférases, enzymes qui phosphorylent ou adénylent les aminoglycosides, inactivant ainsi ces antibiotiques. Les isolats contenant ces gènes, tels que L03, L01, V237.2, et V281.2, montrent une moindre résistance aux aminoglycosides (GMN).

Résistance aux sulfamides et aux triméthoprimes (SXT) :

Les isolats L03, L11, et L01 montrent une résistance significative au triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT), correspondant à la présence des gènes *sul1* et *sul2*.

Ces gènes présents chez ces souches, codent pour des dihydropteroate synthases résistantes aux sulfamides. Les gènes *dfrA12* et *dfrA14* codent pour des dihydrofolate réductases résistantes au triméthoprime.

Quasiment l'ensemble des souches étudiées montrent une résistance généralisée à plusieurs classes d'antibiotiques, preuve d'une acquisition de gènes engendrant une multirésistance aux antibiotiques.

La présence des gènes *blaCTX-M15*, *blaSHV-11*, *fosA*, *oqxA*, *oqxB19*, *qacEdelta1*, *qnrS1*, *sul1*, et *sul2* suggère une multirésistance due à la présence de multiples gènes codant pour diverses mécanismes de résistance, incluant des  $\beta$ -lactamases, des résistances aux quinolones, et des résistances aux sulfamides et aux triméthoprimes.

L'arbre phylogénétique associé à la heatmap, permet de visualiser la corrélation entre les relations évolutives et les profils de résistance aux antibiotiques. Ainsi, comme attendus, certaines souches de même espèce issues de mêmes espèces hôtes, présentent des profils de résistances similaires.

Les souches V237.1 et V237.2 sont très proches l'une de l'autre, suggérant une très faible divergence génétique. Cela est cohérent avec leur profil génétique très similaire.

La souche V303 est également proche de ce groupe, partageant plusieurs gènes de résistance, bien que légèrement plus éloignée que V237.1 et V237.2.

BV1 et BV2 sont également très proches l'une de l'autre, suggérant une relation étroite. Ces souches partagent des gènes de résistance similaires tels que *blaACT*, *fosA*, *oqxA* et *oqxB*.

Les souches L03 et L11 sont groupées ensemble, indiquant une relation génétique proche. Elles partagent des gènes de résistance aux sulfamides (*sul2*) et aux quinolones (*gyrA*, *parC*).

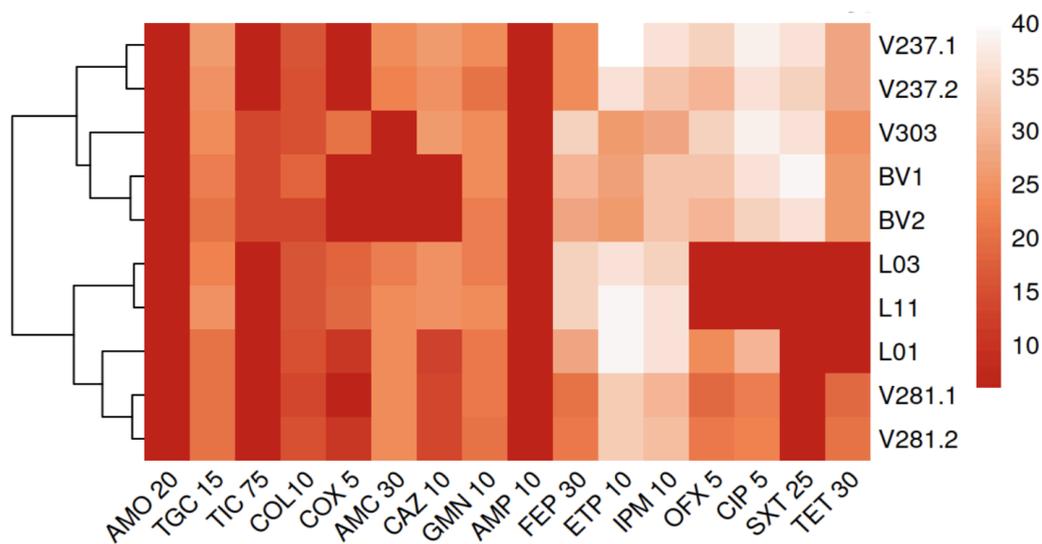


Fig.8. Heatmap de la multirésistance des souches en fonction des antibiotiques testés

Heatmap réalisée à partir des diamètres d'inhibition observés pour 16 antibiotiques testés par antibiogrammes.

Rouge : souche totalement résistante, Blanc: souches très sensible, gradient en fonction des diamètres d'inhibition

La souche L01 apparaît plus distincte, bien qu'elle soit encore reliée à L03 et L11. Elle partage plusieurs gènes de résistance avec L03 et L11 mais présente également des différences notables.

Les souches V281.1 et V281.2 sont très proches, suggérant une relation génétique très étroite. Elles partagent des gènes de résistance aux aminoglycosides (*aadA2*), ainsi qu'aux bêta-lactamines (*blaCTX-M15*) et d'autres gènes de résistance.

## 7. Etude de cas n°1: *Escherichia coli* BLSE - L03

Le logiciel mob\_recon a été utilisé pour détecter et analyser les éléments génétiques mobiles (EGM) comme les plasmides à partir des séquences obtenues, tandis que Prokka a permis une annotation rapide des génomes bactériens, prédisant et annotant les gènes et éléments génétiques présents pour une analyse fonctionnelle et structurale complète. Deux souches ont été analysées pour identifier les plasmides chez les entérobactéries résistantes.

Le plasmide Lapin\_01, issu de l'échantillon L03, de 68887 pb, provient d'une souche d'*E. coli* résistante aux  $\beta$ -lactamines à spectre élargi (BLSE) d'un élevage de lapin et est non mobilisable, limitant son transfert par conjugaison entre bactéries. Néanmoins, les gènes de ce plasmide peuvent être transférés via co-intégration dans d'autres plasmides ou chromosomes, transformation par capture d'ADN libre, transduction par bactériophages, ou mobilisation assistée. Ces mécanismes peuvent ainsi engendrer une dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.

L'analyse détaillée de la carte plasmidique, générée par Prokka à partir d'un séquençage complet du génome, a révélé la présence de gènes significatifs classés en différentes catégories fonctionnelles (Fig.9).

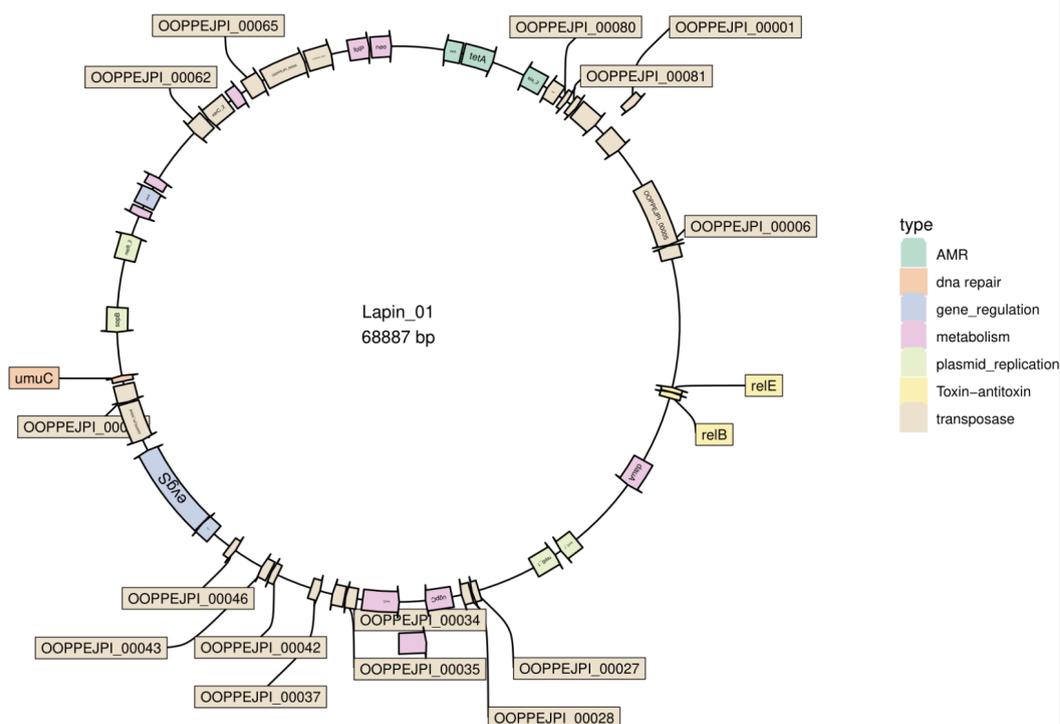


Fig.9. Carte de prédiction de la position des gènes sur un plasmide issu d'une *E.coli* résistante BLSE trouvée dans un élevage de lapins (L03\_Mep1\_BLSE)

Annotation des gènes en fonction des différents types et fonctions des gènes.

Gènes de résistance aux antibiotiques :

***tetA*** : Ce gène code pour une pompe à efflux qui confère une résistance aux tétracyclines en expulsant l'antibiotique hors de la cellule. Cette expulsion réduit la concentration intracellulaire de l'antibiotique, permettant ainsi à la bactérie de survivre et de se multiplier en présence de tétracyclines. La présence de *tetA* est courante dans les souches bactériennes résistantes aux tétracyclines, ce qui suggère une pression sélective continue pour maintenir cette résistance.

***bla\_2*** : Ce gène code pour des bêta-lactamases, enzymes responsables de l'hydrolyse des antibiotiques bêta-lactamines. Les bêta-lactamases dégradent l'anneau bêta-lactame central des antibiotiques bêta-lactamines, les inactivant ainsi et rendant les antibiotiques inefficaces. Ce gène produit une bêta-lactamase spécifique, qui peut avoir un spectre de substrat varié selon la variante spécifique de l'enzyme.

La présence rapprochée des gènes de résistance permet leur co-sélection sous la pression de l'utilisation de multiples antibiotiques. Par exemple, l'utilisation de tétracyclines peut co-sélectionner des bactéries résistantes aux sulfamides, aminoglycosides, et bêta-lactamines. Ces gènes proches peuvent être transférés ensemble via des événements de conjugaison, facilitant la propagation rapide de la multirésistance entre les bactéries.

Gènes de réparation de l'ADN

***umuC*** : Ce gène est impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN par le biais de la mutagenèse induite par l'ADN. La présence de ce gène suggère une capacité accrue de la bactérie à survivre et se proliférer même sous stress génotoxique, ce qui peut être un avantage sélectif sous traitement antibiotique.

Gènes de régulation

***evgS*** : Ce gène code pour une kinase sensorielle faisant partie du système de régulation à deux composants EvgS/EvgA, impliqué dans la réponse à divers stress environnementaux. Ce système de régulation pourrait jouer un rôle dans l'adaptation et la survie de la bactérie dans des conditions adverses, y compris en présence d'antibiotiques.

Gènes de métabolisme

Certains gènes impliqués dans le métabolisme sont également observables sur ce plasmide. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans divers aspects du métabolisme cellulaire et des voies métaboliques secondaires. Bien que leur lien direct avec la résistance aux antibiotiques ne soit pas évident, ces gènes peuvent contribuer à la robustesse métabolique de la bactérie.

Gènes de répllication plasmidique

***rep, sop*** : Ces gènes codent pour des protéines nécessaires à la répllication et la maintenance du plasmide. La présence de multiples gènes de répllication suggère une capacité accrue du plasmide à se répliquer de manière stable au sein des cellules hôtes.

Gènes toxine-antitoxine

***relE, relB*** : Ces gènes codent pour des systèmes toxine-antitoxine, où *RelE* est la toxine et *RelB* l'antitoxine. Ces systèmes sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire et la réponse au stress.

Ces gènes peuvent aider à la stabilisation du plasmide dans les communautés bactériennes, en tuant les cellules sans plasmides par la production de toxines si le plasmide est perdu, assurant ainsi le maintien du plasmide dans la population bactérienne.

Gènes de transposase :

Ces gènes sont impliqués dans la mobilité des éléments génétiques au sein du génome bactérien en catalysant le déplacement de transposons (segment d'ADN), d'un endroit à un autre au sein du génome bactérien ou entre les molécules d'ADN.

La présence de ces gènes indique une capacité potentielle de transfert horizontal de gènes, facilitant la dissémination de la résistance aux antibiotiques à travers différentes souches bactériennes. L'activité des transposases accélère l'évolution bactérienne, augmentant leur adaptabilité face aux pressions de sélection des antibiotiques.

## 8. Etude de cas n°2: *Klebsiella* persistante BLSE - V281.1

Le plasmide Volaille\_01, de taille 203866 pdb (Fig.10), est issu d'une souche de *Klebsiella* isolée d'un échantillon de volaille. Ce plasmide est mobilisable et non conjugatif et comprend plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, ainsi que d'autres gènes fonctionnels, classés en différentes catégories. Les plasmides mobilisables sont capables de se déplacer entre les bactéries par des mécanismes de mobilisation mais ne peuvent pas se conjuguer directement avec d'autres bactéries sans l'aide d'un plasmide conjugatif. Cela influence leur potentiel de propagation dans une population bactérienne.

L'analyse détaillée de cette carte plasmidique révèle une répartition stratégique des gènes qui peuvent jouer un rôle clé dans la survie et l'adaptabilité de la bactérie sous diverses conditions environnementales et expliquer notamment la persistance de certaines bactéries au sein des élevages.

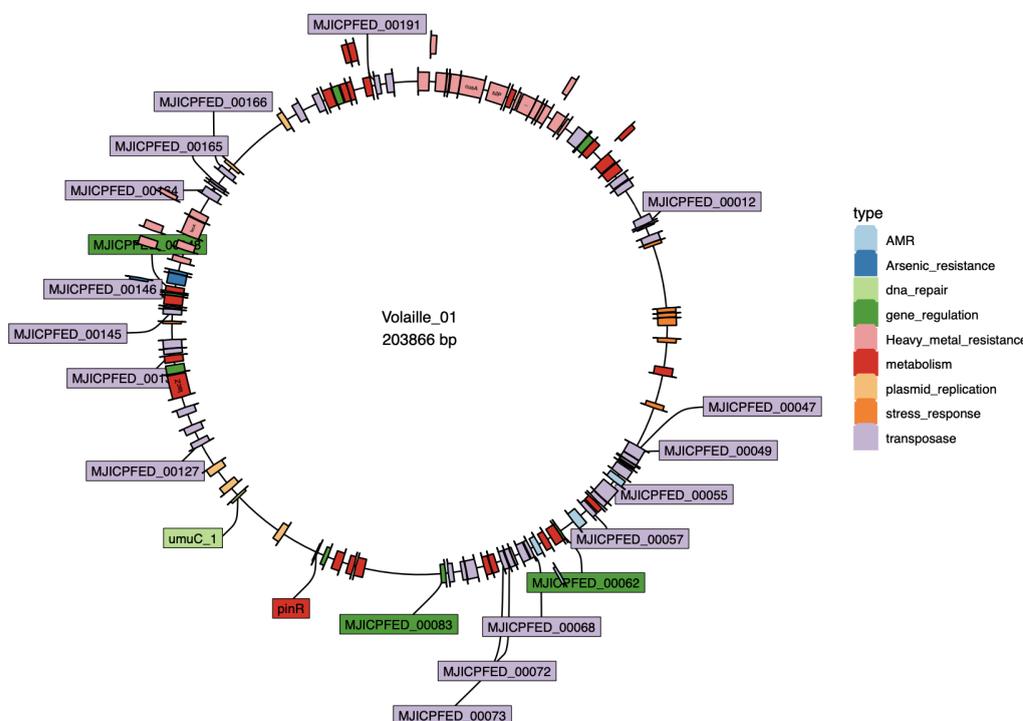


Fig.10. Carte de prédiction de la position des gènes sur un plasmide issu d'une *Klebsiella* résistante BLSE trouvée dans un élevage de volaille (V281\_Mep1\_BLSE)

Annotation des gènes en fonction des différents types et fonctions des gènes.

Gènes de résistance aux antibiotiques :

Les gènes de résistance, comme ceux codant pour les BLSE, confèrent à la bactérie la capacité de dégrader un large éventail de bêta-lactamines. Les gènes précis de résistance dans le cadre de ce plasmide n'ont pas été identifiés.

Gènes de résistance aux métaux lourds :

***fecA*** : Ce gène est généralement associé à la résistance au fer. Bien que le fer ne soit pas un métal lourd, la présence de ce gène sur le plasmide peut indiquer une capacité accrue de la bactérie à gérer et à résister aux stress environnementaux, y compris aux métaux lourds.

***cusA*** : La présence de *cusA* confère à la bactérie une capacité à expulser le cuivre hors de la cellule, limitant ainsi sa toxicité.

***silP*** : Ce gène est impliqué dans la résistance à l'argent. L'argent ayant des propriétés antimicrobiennes, *silP* permet à la bactérie de réduire l'impact de l'argent en l'expulsant de la cellule.

***copA*** : Comme *cusA*, *copA* est également un gène de résistance au cuivre. Les deux gènes se trouvent ensemble sur le même plasmide, renforçant la capacité de la bactérie à survivre dans des environnements riches en cuivre.

L'ensemble de ces gènes ainsi que la présence d'un gène de résistance à l'arsenic confèrent à la bactérie une résistance accrue aux métaux lourds lors de l'utilisation de détergents dans le cadre de désinfection des bâtiments d'élevages entre différents lots d'animaux. Ils permettent également de favoriser la survie des bactéries dans des environnements contaminés et peuvent engendrer des risques de co-sélection de résistances à d'autres agents, y compris antibiotiques.

Gènes de réponse aux stress environnementaux :

La présence de gènes de réponse au stress environnemental permet à la bactérie de s'adapter et de survivre dans des conditions hostiles, telles que des variations extrêmes de pH et de température, des niveaux élevés de salinité, ou la présence de toxines comme les métaux lourds et l'arsenic. Ces gènes facilitent la détoxification des substances nocives, la réparation de l'ADN endommagé et la protection contre le stress oxydatif. En augmentant la résilience et la survie des bactéries dans des environnements perturbés, ces gènes peuvent également contribuer indirectement à la résistance aux antibiotiques par des mécanismes de co-sélection, rendant la gestion de la résistance bactérienne plus complexe.

Gènes de réplication du plasmide :

Les gènes impliqués dans la réplication du plasmide assurent la stabilité et la transmission efficace du plasmide contenant des gènes de résistance aux métaux lourds, à l'arsenic et aux stress environnementaux lors de la division cellulaire. Leur présence permet une multiplication rapide du plasmide, facilitant le transfert horizontal de ces gènes entre différentes souches bactériennes et espèces, et renforçant ainsi la capacité adaptative et la résilience des bactéries. Bien qu'ils représentent une charge métabolique, ces gènes permettent aux bactéries de maintenir les avantages conférés par la résistance, contribuant à la persistance et à la propagation de la résistance bactérienne dans divers environnements.

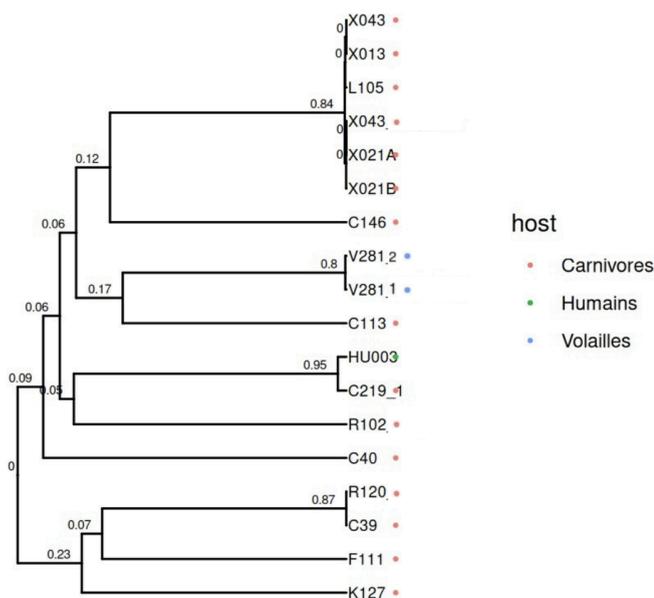
Gènes de transposases:

A partir de ce plasmide, une multitude de gènes codants pour des transposases peuvent être observés. Ces gènes sont impliqués dans la mobilité des éléments génétiques. Les transposases catalysent le déplacement des transposons, facilitant le transfert horizontal des gènes, y compris ceux de résistance aux antibiotiques, entre les bactéries. La présence d'un grand nombre de gènes codant pour des transposases indique une mobilité génétique accrue, facilitant le remaniement et le transfert des gènes, y compris ceux de résistance aux antibiotiques. Cela confère à la bactérie une adaptabilité et une survie améliorées face aux pressions environnementales, tout en permettant une dissémination rapide des gènes de résistance au sein et entre les populations bactériennes.

## 9. Arbres phylogénétiques

L'arbre phylogénétique des *Klebsiella pneumoniae* résistantes BLSE montre des relations évolutives et des échanges génétiques entre souches de carnivores, d'humains et de volailles (Fig.11 A). Les clusters de carnivores X043, X013, L105, X021A et X021B présentent une divergence minimale (0 à 0.84), suggérant une évolution récente ou des échanges génétiques fréquents. Les souches de volailles V281.1 et V281.2 sont également proches avec une distance de 0.8. Un cluster mixte comprenant C113 (carnivore), HU003 (humain) et C219\_1 (carnivore) à des distances de 0.95, indiquant des échanges possibles entre humains et carnivores. Un autre cluster mixte, R102 (volaille) et C40 (carnivore), avec une distance de 0.95, indique un transfert potentiel de gènes de résistance. Les souches carnivores R120, C39, F111 et K127 montrent une diversité génétique modérée (0.87 à 0.23). La souche isolée C146 de carnivore, avec des distances minimales de 0.06 à 0.84, pourrait avoir évolué indépendamment ou résulter d'une ancienne divergence. Ces observations soulignent des transferts potentiels de gènes de résistance tout en révélant une évolution indépendante au sein des clusters de carnivores.

A. Arbre phylogénétique de souches de *Klebsiella pneumoniae*



B. Arbre phylogénétique pour les souches d'*Enterobacter cloacae*

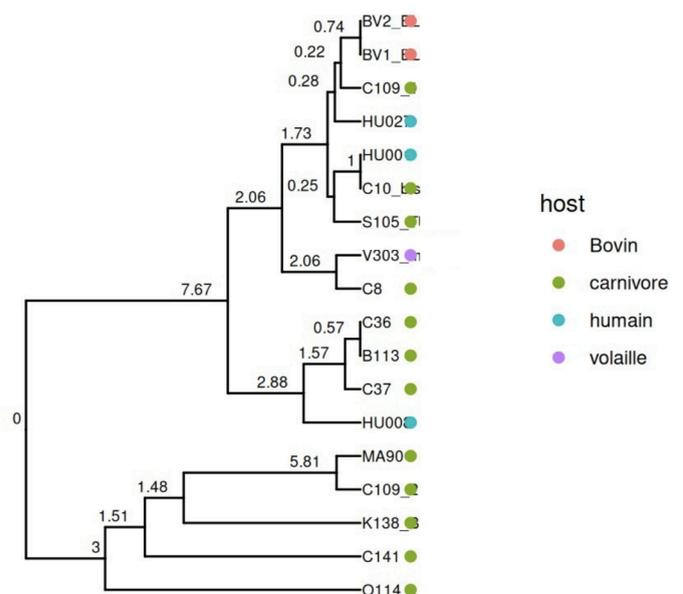


Fig.11. Arbres phylogénétiques des souches identifiées de *Klebsiella pneumoniae* (A) et d'*Enterobacter cloacae* (B)

L'arbre phylogénétique des *Enterobacter cloacae* montre plusieurs clusters distincts. Les souches bovines (BV1, BV2) sont proches, avec des distances de 0.22 et 0.74, suggérant une divergence minimale et une évolution récente ou des échanges fréquents. Les souches humaines (HU002, HU000) montrent une divergence de 1.73, indiquant une relation proche. Les souches de carnivores (C8, C36, C37, C109, C141) présentent des distances variées (0.57 à 2.88), indiquant une diversité génétique importante. Un cluster mixte (V303 de volaille, C8 de carnivore, HU000 d'humain) présente des distances de 2.06 entre V303 et C8, et de 1 avec HU000, suggérant des échanges possibles. La souche O114 de carnivore est très divergente avec une distance de 7.67, suggérant une évolution indépendante. Les transferts potentiels de gènes de résistance sont observés entre volaille et carnivore, ainsi qu'entre humain et carnivore.

L'arbre phylogénétique des *E. coli* résistantes BLSE montre des relations évolutives entre des souches de carnivores, d'humains, de lapins et de volailles (Annexe 3). Les distances très courtes (0 à 0.5) suggèrent une divergence récente ou des échanges fréquents, souvent liés à une transmission directe ou un environnement commun. Cela peut indiquer une clonalité, où les souches, ayant une origine commune très récente, se retrouvent dans des épidémies locales ou des clusters. Les distances modérées (0.5 à 1.0) révèlent une diversité génétique modérée, résultant d'une évolution indépendante sur une période plus longue ou de multiples sources d'introduction. Les distances importantes (1.0 à 1.96) signalent une évolution indépendante sur une période prolongée, suggérant une séparation géographique ou écologique limitant les échanges génétiques. Ces distances peuvent indiquer une divergence ancienne, où les souches ont accumulé des différences génétiques (mutations, adaptations spécifiques). Les clusters de souches de carnivores comme D152 et C120, ainsi qu'AMR38, AMR120 et AMR100, montrent une divergence minimale, suggérant une évolution récente ou des échanges fréquents. Les clusters de carnivores présentent une diversité évolutive avec des distances de 0.15 à 0.54, indiquant une diversité génétique modérée. Un cluster mixte comprenant C31 (carnivore) et HU042 (humain), avec une distance de 0, indique des échanges génétiques possibles. Les souches L03 et L11 montrent une grande similarité génétique, tandis que la souche de lapin L01, ayant divergé de façon importante, se rapproche des bactéries de carnivores, indiquant une évolution indépendante ou une divergence ancienne. Les clusters de volailles, représentés par des souches comme V281.1, montrent des relations proches avec des distances évolutives minimales. La souche résistante aux carbapénémases AMR100\_CARBA suit un profil de divergence distinct, suggérant une évolution indépendante. Ces observations soulignent des transferts potentiels de gènes de résistance et révèlent une diversité génétique importante au sein des *E. coli*, tout en indiquant des échanges possibles entre différents hôtes.

## Discussion

L'étude menée dans le cadre de ce stage a permis d'explorer la résistance aux antibiotiques chez différentes entérobactéries isolées d'échantillons humains, animaux et environnementaux, en mettant l'accent sur les implications évolutives et les stratégies de propagation des gènes de résistance. Les résultats obtenus révèlent des perspectives significatives quant à la dynamique complexe de l'antibiorésistance et soulèvent des questions cruciales quant à sa gestion future. Il est cependant important de souligner que les résultats obtenus à partir des échantillons prélevés dans les élevages présentent certaines limites quant à leur représentativité.

## **Échantillonnages et prélèvements**

En raison du faible nombre d'échantillons testés par rapport à la diversité des sources potentielles (humains, animaux, environnement), il est important de considérer que les pourcentages de prévalence des résistances aux antibiotiques ne peuvent pas être extrapolés comme des taux d'infection. Cette limitation pourrait conduire à une surestimation ou une sous-estimation de la véritable prévalence de ces résistances dans la population bactérienne des élevages.

Pour améliorer la représentativité des résultats, l'augmentation de la taille de l'échantillon est essentielle. Un nombre plus élevé d'échantillons devrait être collecté et analysé au cours des deux prochaines années afin d'obtenir une meilleure représentation de la diversité génétique et de la prévalence des résistances. Cela permettrait de réduire les biais dus à la sous-représentation des diverses souches bactériennes présentes dans les élevages. De plus, une approche multi-compartmentale serait bénéfique en élargissant la collecte d'échantillons pour inclure non seulement d'autres types d'élevages, mais aussi d'autres environnements comme les hôpitaux, les cliniques vétérinaires. Cette approche fournirait une image plus complète des flux génétiques et de la transmission des résistances entre différents compartiments.

Parallèlement, l'intégration de techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) telles que MinION Oxford Nanopore, permet une analyse plus approfondie des génomes bactériens, facilitant la détection précise des gènes de résistance et des éléments génétiques associés. Enfin, l'exploration de techniques comme la métaprotéomique ou la métagénomique pourrait offrir des insights supplémentaires sur les mécanismes de résistance en étudiant non seulement la présence de gènes de résistance, mais aussi leur expression et leur fonction dans les microbiomes complexes des élevages. Ces approches complémentaires pourraient grandement contribuer à une meilleure compréhension des interactions entre les gènes de résistance et l'environnement bactérien, renforçant ainsi les stratégies de gestion de l'antibiorésistance dans les élevages.

## **Identification des gènes de résistance et corrélation avec les profils de résistance**

La réalisation d'antibiogrammes est une méthode standard pour évaluer la sensibilité des souches bactériennes à divers antibiotiques. Il est important de noter que la qualité des échantillons pouvait cependant varier en fonction des conditions de conservation, pouvant introduire des biais dans l'interprétation des résultats. Le séquençage complet des génomes par la technologie MinION Oxford Nanopore a permis une amélioration significative dans la détection précise des gènes de résistance de potentielle corrélation directe avec les profils des antibiogrammes observés en permettant également une exploration plus approfondie des résistances multiples et de leur distribution génétique au sein des populations bactériennes. Cette approche a permis non seulement d'identifier les gènes spécifiques responsables des résistances, mais aussi de comprendre leur contexte génétique et leur potentiel de transfert horizontal.

## **Divergence génétique et évolution des gènes de résistance**

Il est essentiel de rappeler que l'objectif de ce stage était d'étudier la circulation et les transferts de gènes de résistance entre les compartiments humains, animaux et environnementaux. Les arbres phylogénétiques ont révélé des clusters génétiques étroitement apparentés entre certaines souches, malgré leur origine distincte, indiquant des échanges potentiels de matériel génétique entre les différentes espèces.

D'un point de vue méthodologique, les résultats obtenus à partir des arbres phylogénétiques peuvent être considérés comme solides dans la mesure où ils reposent sur des données de séquençage génomique de bonne qualité, prouvées par les analyses bioinformatiques réalisées. Cependant, pour renforcer ces résultats, il serait bénéfique d'augmenter le nombre d'échantillons et d'inclure une diversité plus large de souches bactériennes provenant de différents sites géographiques ou environnementaux. Cela permettrait une représentation plus exhaustive des flux génétiques et des transferts de gènes entre les compartiments, réduisant ainsi les biais potentiels dus à une sous-représentation des souches.

Sur le plan scientifique, cette étude répond en partie aux questions initiales en démontrant clairement que les souches bactériennes provenant de différents compartiments peuvent partager des similitudes génétiques étroites, suggérant des échanges génétiques transversaux. Ces résultats élargissent la réflexion sur la propagation de la résistance aux antibiotiques en mettant en évidence la complexité des interactions entre les populations bactériennes humaines, animales et environnementales et prouvent ainsi la nécessité de la mise en place d'une surveillance continue de la propagation de ces gènes sur l'ensemble des compartiments. Ils soulèvent également de nouvelles questions sur les mécanismes précis de transfert génétique, la fréquence des échanges entre les compartiments et leur impact sur la diversité génétique bactérienne à l'échelle globale.

### **Propagation des gènes de résistance à travers les plasmides**

Les plasmides identifiés dans cette étude jouent un rôle central dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. Les plasmides mobilisables, bien que non conjugatifs, facilitent la dissémination horizontale des gènes de résistance entre les bactéries au sein d'une même espèce et parfois même entre espèces différentes.

La présence de gènes de résistance aux métaux lourds comme le cuivre, l'argent et l'arsenic sur ces plasmides renforce la capacité des bactéries à survivre dans des environnements contaminés, accroissant ainsi le risque de co-sélection avec d'autres types de résistance. L'ensemble de ces gènes retrouvés sur un même plasmide mettent en lumière des adaptations de survie inquiétante pour ces bactéries résistantes. Ces observations impliquent la persistance problématique de certaines bactéries au sein des élevages malgré les nombreuses désinfections entre les vides sanitaires. La co-sélection des gènes de résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques engendre le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques et aux détergents soulevant des préoccupations majeures en termes de santé publique en augmentant la complexité et la gravité de la résistance. Ces résultats permettent également d'expliquer, dans le cas d'un des élevages visités, la présence d'une salmonelle résistante et persistante malgré les désinfections, engendrant des problèmes sanitaires et économiques pour les éleveurs.

### **Adaptation des conditions d'hygiène et de biosécurité dans les élevages**

La diminution de l'utilisation des antibiotiques dans les élevages ces dernières années, constitue une avancée importante vers la réduction de la pression de sélection des bactéries résistantes. Cette évolution est cruciale pour atténuer le risque d'émergence et de propagation de l'antibiorésistance au sein des populations bactériennes des élevages.

Cependant, malgré cette réduction, les pratiques de biosécurité et les conditions d'hygiène demeurent des facteurs essentiels pour maintenir un environnement sain et réduire les risques associés à la transmission des pathogènes résistants. Les résultats soulignent également l'importance cruciale d'une adaptation des conditions d'hygiène et de biosécurité au sein des élevages. Les pratiques actuelles ainsi que des mauvaises utilisations de biocides ou de

détergent favorisent souvent la sélection de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques et aux métaux lourds, créant ainsi un réservoir potentiel de co-résistance. Des mesures telles que l'amélioration des pratiques d'assainissement, la réduction de l'utilisation d'antibiotiques à des fins prophylactiques, et la promotion de méthodes alternatives de contrôle des infections pourraient contribuer à atténuer la propagation de l'antibiorésistance dans les élevages.

Il serait notamment pertinent d'associer nos résultats à partir des échantillonnages réalisés, aux pratiques sanitaires et de biosécurité pour chaque éleveurs en prenant en compte l'environnement de l'élevage, les pratiques de désinfections et les contacts potentiels avec des animaux extérieurs.

### **Stratégies de lutte contre l'antibiorésistance**

La lutte contre l'antibiorésistance est une priorité mondiale cruciale, et les recherches telles que celles présentées dans ce rapport jouent un rôle essentiel dans le développement de stratégies efficaces. Le Plan Écoantibio 2, revêt ainsi d'une importance majeure dans la lutte contre l'antibiorésistance. Les résultats de cette étude apportent des contributions significatives à cet effort apportant des informations concernant les mécanismes de résistance et les voies de transmission des gènes de résistance au sein des élevages.

D'un point de vue méthodologique, les résultats obtenus soulignent l'importance de méthodes de surveillance robustes et de techniques de séquençage avancées pour étudier la diversité génétique des pathogènes et des résistances associées.

Sur le plan scientifique, cette étude contribue significativement à répondre aux questions sur la propagation des résistances et l'impact des pratiques d'élevage sur la santé publique. Les résultats mettent en évidence la transmission inter espèces des gènes de résistance, soulignant la nécessité d'approches intégrées pour prévenir leur diffusion. De plus, les divergences génétiques observées entre les souches de différentes origines (humaine, animale) indiquent des transferts génétiques complexes qui nécessitent une attention continue.

Les données issues de ce rapport enrichissent également la réflexion scientifique sur la gestion durable de l'utilisation des antibiotiques. Elles fournissent des insights précieux sur les voies de transmission et permettent de réfléchir à la manière dont les stratégies de biosécurité et d'hygiène peuvent être optimisées pour réduire les risques de propagation des résistances. Il serait ainsi nécessaire d'intégrer les résultats de ce type d'étude aux politiques de santé publique et aux programmes de surveillance dans l'objectif d'instaurer des décisions politiques et réglementaires efficaces pour lutter contre l'antibiorésistance.

## **Conclusion**

Cette étude a ainsi exploré en profondeur la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries isolées d'élevages, en mettant en évidence les implications évolutives et les défis associés à la gestion de l'antibiorésistance. À travers l'analyse de différents échantillons provenant de divers compartiments (humains, animaux, environnement), cette recherche a permis de mettre en lumière la complexité de la dynamique de l'antibiorésistance.

Les résultats obtenus révèlent des perspectives significatives sur la propagation des gènes de résistance, notamment à travers l'identification de plasmides facilitant la dissémination horizontale des résistances aux antibiotiques et aux métaux lourds.

Cela souligne l'importance critique de surveiller et de réguler l'utilisation des antibiotiques dans les élevages, malgré une diminution observée au cours des dernières années.

Une des limites principales de cette étude réside dans le nombre limité d'échantillons analysés, ce qui nécessite une augmentation de la taille des échantillons pour renforcer la représentativité des résultats qui sera réalisée sur les deux prochaines années dans le cadre du plan Ecoantibio 2.

De plus, l'approche multi-compartimentale s'est avérée essentielle pour obtenir une image complète des transferts génétiques de résistance et des dynamiques d'évolution des bactéries dans les différents compartiments. L'utilisation de technologies de séquençage de nouvelle génération comme MinION Oxford Nanopore s'est avérée cruciale pour une meilleure compréhension des mécanismes de résistance et leur diversité génétique.

Ces résultats mettent ainsi en évidence la nécessité urgente d'améliorer les pratiques de biosécurité et d'hygiène pour réduire les risques de propagation des résistances, de réduire l'utilisation des antibiotiques au sein des élevages. Ils mettent également en évidence la nécessité d'une approche intégrée incluant des politiques de santé publique efficaces et des stratégies de surveillance continue pour prévenir l'émergence de souches bactériennes résistantes.

En conclusion, cette étude contribue de manière significative à notre compréhension des défis posés par l'antibiorésistance dans les élevages. Elle souligne l'importance cruciale d'une approche holistique et collaborative pour développer des stratégies de lutte efficaces et ouvre de nouvelles perspectives en termes de génomiques et d'analyses bioinformatiques dans l'objectif de réaliser une surveillance plus performante. L'application de ce type de résultats de recherche dans les politiques et les pratiques agricoles est indispensable pour garantir la sécurité alimentaire et la santé publique à long terme.

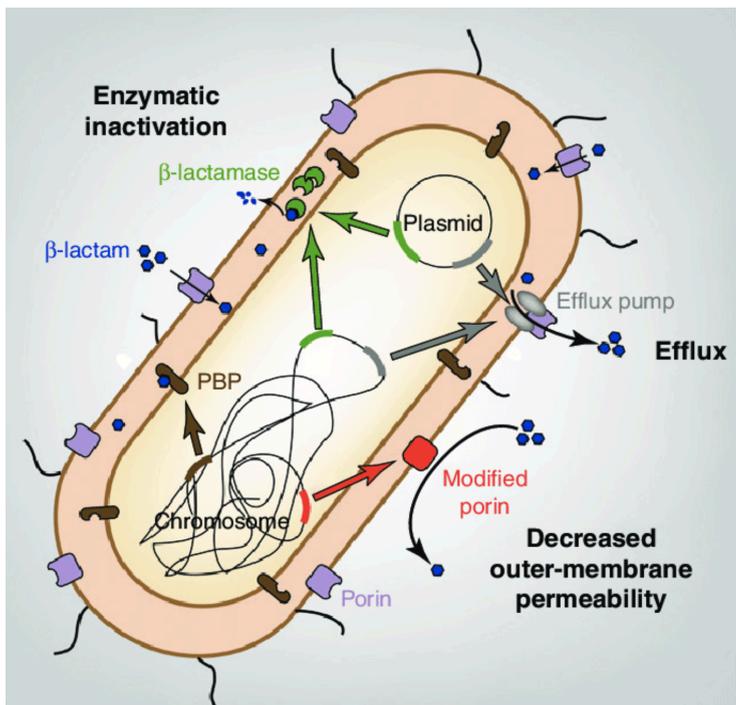
## Bibliographie

1. Antonioli A, 2021 : Evaluation de la consommation d'antibiotiques et de l'antibiorésistance bactérienne chez les petits carnivores domestiques de l'île de la Réunion et identification de facteurs de risque associés. Rapport de stage Master 2 gestion Intégrée des Maladies Animales Tropicales.
2. Arnold, B. J., Huang, I., & Hanage, W. P. (2021). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(4), 206-218. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00650-4>
3. Caniça, Manuela, Vera Manageiro, Daniela Jones-Dias, Lurdes Clemente, Eduarda Gomes-Neves, Patrícia Poeta, Elsa Dias, et Eugénia Ferreira. « Current perspectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs ». *Research in Microbiology*, Special Issue: Trends in Environmental Microbiology for Public Health, 166, n° 7 (1 septembre 2015): 594-600. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.07.009>.
4. Consommation d'antibiotiques et prévention de l'antibiorésistance en France en 2021 : où en sommes-nous? (2022). <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2022/consommation-d-antibiotiques-et-prevention-de-l-antibioresistance-en-france-en-2021-ou-en-sommes-nous>
5. De Mesquita Souza Saraiva, M., Lim, K., Monte, D. F., Givisiez, P. E. N., Alves, L. B. R., De Freitas Neto, O. C., Kariuki, S., Júnior, A. B., De Oliveira, C. J. B., & Gebreyes, W. A. (2021). Antimicrobial resistance in the globalized food chain : a One Health perspective applied to the poultry industry. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 53(1), 465-486. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00635-8>
6. Duin, David van, Keith S. Kaye, Elizabeth A. Neuner, et Robert A. Bonomo. « Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes », *Diagnostic microbiology and infectious disease* 75, n° 2 (février 2013): 115-20. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.009>.

- 7.Founou, L. L., & Founou, R. C. (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain : A Developing Country-Perspective. *Frontiers In Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- 8.Frossard, E., Swennen, B., & Baret, P. V. (2015). "Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental bacterial populations." *Current Opinion in Microbiology*, 27, 37-42.
- 9.Gay, N., Lugagne, N., Miltgen, G., Belmonte, O., & Cardinale, E. (2020). Reunion, a sentinel island for multidrug-resistant bacteria surveillance in South-western Indian ocean : a retrospective survey using hospitalised patients screening, 2015-2017. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-15589/v1>
- 10.Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). (2022). Dans <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>. World Health Organization <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364996/9789240062702-eng.pdf?sequence=1>
- 11.Graham, D. W., Bergeron, G., Bourassa, M. W., Dickson, J., Gomes, F., Howe, A., Kahn, L. H., Morley, P. S., Scott, H. M., Simjee, S., Singer, R. S., Smith, T. C., Storrs, C., & Wittum, T. E. (2019). Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1441(1), 17-30. <https://doi.org/10.1111/nyas.14036>
- 12.Kasimanickam, Vanmathy, Maadhanki Kasimanickam, et Ramanathan Kasimanickam. « Antibiotics Use in Food Animal Production: Escalation of Antimicrobial Resistance: Where Are We Now in Combating AMR? » *Medical Sciences* 9, n° 1 (mars 2021): 14. <https://doi.org/10.3390/medsci9010014>.
- 13.Kidsley, Amanda K., Rhys T. White, Scott A. Beatson, Sugiyono Saputra, Mark A. Schembri, David Gordon, James R. Johnson, et al. « Companion Animals Are Spillover Hosts of the Multidrug-Resistant Human Extraintestinal Escherichia Coli Pandemic Clones ST131 and ST1193 ». *Frontiers in Microbiology* 11 (2020): 1968. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01968>.
- 14.Kim, Dae-Wi, et Chang-Jun Cha. « Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission ». *Experimental & Molecular Medicine* 53, n° 3 (1 mars 2021): 301-9. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>.
- 15.MacGowan, Alasdair, et Emily Macnaughton. « Antibiotic resistance ». *Medicine* 45, n° 10 (1 octobre 2017): 622-28. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>.
- 16.Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources : Potential Public Health Implications. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 23(4), 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
- 17.Miltgen, Guillaume, Daniel Martak, Benoit Valot, Laure Kamus, Thomas Garrigos, Guillaume Verchere, Houssein Gbaguidi-Haore, et al. « One Health Compartmental Analysis of ESBL-Producing Escherichia Coli on Reunion Island Reveals Partitioning between Humans and Livestock ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 77, n° 5 (27 avril 2022): 1254-62. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac054>.
- 18.Nunan, C. (2022). "Ending routine farm antibiotic use in Europe : Achieving responsible farm antibiotic use through improving animal health and welfare in pig and poultry production". *Rapport epha.org* <https://epha.org/wp-content/uploads/2022/02/report-ending-routine-farm-antibiotic-use-in-europe-final-2022.pdf>
- 19.Oz, Tugce, Aysegul Guvenek, Sadik Yildiz, Enes Karaboga, Yusuf Talha Tamer, Nirva Mumcuyan, Vedat Burak Ozan, et al. « Strength of Selection Pressure Is an Important Parameter Contributing to the Complexity of Antibiotic Resistance Evolution ». *Molecular Biology and Evolution* 31, n° 9 (1 septembre 2014): 2387-2401. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu191>.
- 20.Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria : Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers In Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

21. Pitout, Johann DD, et Kevin B. Laupland. « Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: An Emerging Public-Health Concern ». *The Lancet Infectious Diseases* 8, n° 3 (1 mars 2008): 159-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0).
22. Pruden, Amy, D.G. Joakim Larsson, Alejandro Amézquita, Peter Collignon, Kristian K. Brandt, David W. Graham, James M. Lazorchak, et al. « Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment ». *Environmental Health Perspectives* 121, n° 8 (août 2013): 878-85. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206446>.
23. Quelques mesures du plan d'action national français « une seule santé » de lutte contre l'antibiorésistance". (2022). Dans [antibiotiques.gouv.fr](https://sante.gouv.fr). Ministère des Solidarités et de la Santé. [https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/brochure\\_mesures\\_innovantes\\_lutte\\_atbr-fr\\_vf.pdf](https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/brochure_mesures_innovantes_lutte_atbr-fr_vf.pdf)
24. Rabaly C, 2023 : Etat des lieux et caractérisation de l'antibiorésistance des Enterobacteriaceae des carnivores domestiques errant, divagants et confinés sur l'île de La Réunion. Rapport de stage Master 2, Gestion Intégrée des Zoonoses et maladies animales tropicales, Cirad.
25. Rawat, D., & Nair, D. (2010). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram negative bacteria. *Journal Of Global Infectious Diseases*, 2(3), 263. <https://doi.org/10.4103/0974-777x.68531>
26. Résistance aux antibiotiques · Inserm, La science pour la santé. (s. d.). Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/>
27. Rochford, C., Sridhar, D., Woods, N., Saleh, Z., Hartenstein, L., Ahlawat, H., Whiting, E., Dybul, M., Cars, O., Goosby, E., Cassels, A., Velasquez, G., Hoffman, S., Baris, E., Wadsworth, J., Gyansa-Lutterodt, M., & Davies, S. (2018). Global governance of antimicrobial resistance. *Lancet*, 391(10134), 1976-1978. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31117-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31117-6)
28. Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(9), 711-721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
29. Velazquez-Meza, Maria Elena, Miguel Galarde-López, Berta Carrillo-Quiróz, et Celia Mercedes Alpuche-Aranda. « Antimicrobial resistance: One Health approach ». *Veterinary World* 15, n° 3 (mars 2022): 743-49. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.743-749>.
30. Quelques mesures du plan d'action national français “une seule santé” de lutte contre l'antibiorésistance. (2022). Dans <https://sante.gouv.fr>. Ministère des Solidarités et de la Santé. [https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/brochure\\_mesures\\_innovantes\\_lutte\\_atbr-fr\\_vf.pdf](https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/brochure_mesures_innovantes_lutte_atbr-fr_vf.pdf)

## Annexes

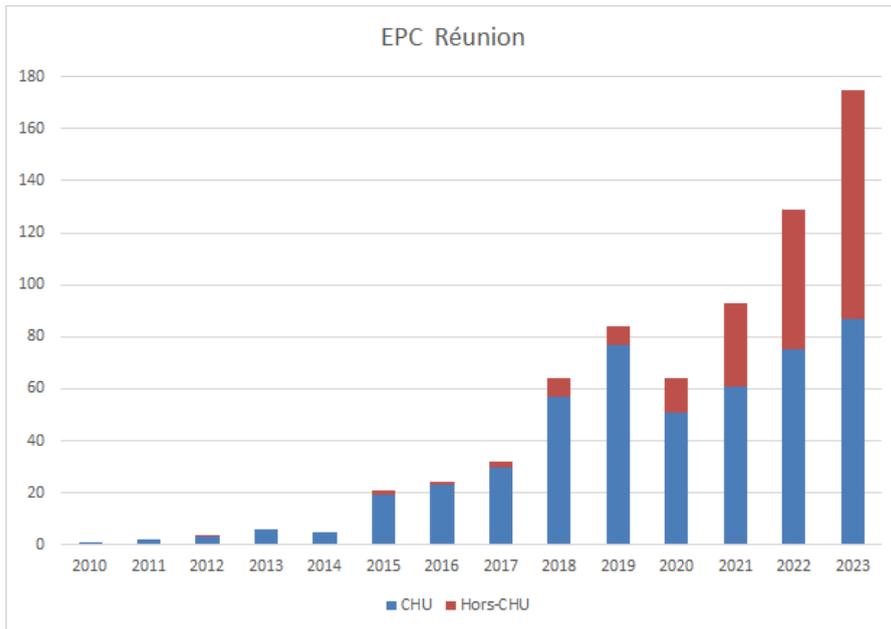


### Annexe 1. Mécanismes génétiques de résistance aux $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries

Gènes chromosomiques ou plasmidiques codant pour  $\beta$ -lactamases, pompes à efflux, Penicillin Binding Protein, transporteurs ... L'ensemble de ces mécanismes génétiques sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

©Nordmann et al (2012). *Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm!*. 18. 263-72.  
10.1016/j.molmed.2012.03.003.

Annexe 2. Evolution du nombre d'entérobacteries productrices de carbapénémases, identifiées en CHU et hors CHU chez l'humain sur l'île de la Réunion



Augmentation exponentielle du nombre d'EPC identifiées à La Réunion sur ces 13 dernières années. Observation inquiétante de l'augmentation des EPC dans un cadre hors CHU.

©Guillaume MILTGEN, CHU Félix GUYON

Annexe 3 Arbre phylogénétique des souches isolées d' *E.coli* issus de divers hôtes

