



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25392

To cite this version:

Massol, Chloé . *Etude de la sensibilité de Mannheimia haemolytica et Pasteurella multocida prélevées en atelier d'engraissement d'agneaux par détermination de la CMI*. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 54 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ETUDE DE LA SENSIBILITE DE *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ET *PASTEURELLA MULTOCIDA* PRELEVEES EN ATELIER D'ENGRAISSEMENT D'AGNEAUX PAR DETERMINATION DE LA CMI

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

MASSOL Chloé

Née, le 07 juillet 1992 à Toulouse (31)

Directeur de thèse : Mme Aude FERRAN

JURY

PRESIDENT :
Mme Christine ROQUES

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
Mme Aude FERRAN
Mme Delphine BIBBAL

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

REPARTITION DES ENSEIGNANTS PAR GRADE

(Mise à jour : 07/09/2018)

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE (6)

Mme	CLAUW Martine.....	SECTION C.N.E.C.A. N° 8
M.	CONCORDET Didier.....	3
M.	DELVERDIER Maxence.....	7
M.	ENJALBERT Francis.....	6
M.	PETIT Claude.....	1
M.	SHELCHER François.....	8

PROFESSEURS 1^{er} CLASSE (17)

M	BAILLY Jean-Denis.....	4
M.	BERTAGNOLI Stéphane.....	1
M.	BERTHELOT Xavier.....	6
M.	BOUSQUET-MELOU Alain.....	7
M.	BRUGERE Hubert.....	10
Mme	CADIERGUES Marie-Christine.....	8
Mme	CHASTANT-MAILLARD Sylvie.....	6
M.	DUCOS Alain.....	6
M.	FOUCRAS Gilles.....	8
Mme	GAYRARD-TROY Véronique.....	7
M	GUERIN Jean-Luc.....	6
Mme	HAGEN-PICARD Nicole.....	6
M.	JACQUIET Philippe.....	8
M.	LEFEBVRE Hervé.....	7
M.	MEYER Gilles.....	8
M.	SANS Pierre.....	6
Mme	TRUMEL Catherine.....	7

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE (7)

Mme	BOULLIER Séverine.....	1
Mme	BOURGES-ABELLA Nathalie.....	7
M.	GUERRE Philippe.....	7
Mme	LACROUX Caroline.....	7
M.	MAILLARD Renaud.....	8
M	MOGICATO Giovanni.....	7
Mme	LETRON-RAYMOND Isabelle.....	7

PROFESSEUR CERTIFIÉ (P.C.E.A.)

Mme	MICHAUD Françoise, Professeur d'Anglais
M.	SEVERAC Benoît, Professeur d'Anglais

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE (11)

M.	BERGONIER Dominique.....	6
Mme	DIQUELOU Armelle.....	8
M.	JAEG Jean-Philippe.....	7
M.	JOUGLAR Jean-Yves.....	8
M.	LYAZRHI Faouzi.....	3
M.	MATHON Didier.....	8
Mme	MEYNADIER Annabelle.....	6
Mme	PRIYMENKO Nathalie.....	6
M.	RABOISSON Didier.....	6
M	VERWAERDE Patrick.....	8
M.	VOLMER Romain.....	1

MAITRES DE CONFERENCES classe normale (24)

M.	ASIMUS Erik.....	8
Mme	BENNIS-BRET Lydie.....	7
Mme	BIBBAL Delphine.....	4
Mme	BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle.....	1
Mme	BOUHSIRA Emilie.....	8
M	CONCHOU Fabrice.....	8
M	CORBIERE Fabien.....	8
M.	CUEVAS RAMOS Gabriel.....	8
Mme	DANIELS Héliène.....	1
Mme	DAVID Laure.....	4
Mlle	DEVIERS Alexandra.....	7
M.	DOUET Jean-Yves.....	8
Mme	FERRAN Aude.....	7
Mme	LALLEMAND Elodie.....	8
Mme	LAVOUE Rachel.....	8
M.	LE LOC'H Guillaume.....	8
M	LIENARD Emmanuel.....	8
Mme	MILA Hanna.....	6
Mme	MEYNAUD-COLLARD Patricia.....	8
M.	NOUVEL Laurent.....	6
Mme	PALIERNE Sophie.....	8
Mme	PAUL Mathilde.....	6
M.	VERGNE Timothée.....	7
Mme	WASET-SZKUTA Agnès.....	6

A.E.R.C. (6)

Mme	BLONDEL Margaux.....	8
M.	CARTIAUX Benjamin.....	7
M.	COMBARROS-GARCIA Daniel.....	8
Mme	COSTES Laura.....	4
M.	GAIDE Nicolas.....	7
M.	JOUSSERAND Nicolas.....	8

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL (2)

Mme	DORE-BORDE Laura.....	8
M.	LEYNAUD Vincent.....	8

Remerciements

À Madame la professeur Christine ROQUES

Professeur de la faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Veillez accepter mes hommages respectueux.

À Madame le Docteur Aude FERRAN,

Maître de conférences de l'École Nationale vétérinaire de Toulouse en physiologie.

Pour m'avoir confiée ce sujet, pour sa gentillesse, sa disponibilité, son aide et sa patience.

Tous mes remerciements.

À Madame le Docteur Delphine BIBBAL,

Maître de conférences de l'École Nationale vétérinaire de Toulouse en hygiène et industrie des aliments d'origine animale.

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

Veillez accepter mes plus sincères remerciements.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	7
Listes des figures	10
Listes des abréviations	11
Introduction	13
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. Les principales bactéries responsables de pathologies respiratoires en atelier d'engraissement	15
A. Pasteurellose : <i>Mannheimia hæmolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i>	15
B. Pneumonie ovine à <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	16
II. Les antibiotiques utilisés : mécanisme d'action et de résistance	17
A. Evaluer l'efficacité d'un antibiotique	17
1. Paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	17
2. Antibiotique temps-dépendant ou concentration-dépendant.....	18
B. Oxytétracycline	18
1. Classe des tétracyclines	18
2. Mécanisme d'action	18
3. Mécanismes de résistance.....	19
C. Florfénicol.....	19
1. Un dérivé du thiamphenicol.....	19
2. Mécanisme d'action	19
3. Résistance	19
D. Sulfadiazine/sulfadiméthoxine.....	20
1. Classe des sulfamides	20
2. Mécanisme d'action	20
3. Résistance	21
4. Sulfamides et CMI.....	21
E. Tilmicosine.....	21
1. Classe des macrolides	21
2. Mécanisme d'action	21
3. Résistance	21
F. Fluméquine.....	22
1. Classe des quinolones	22
2. Mécanisme d'action	22
3. Résistance	22

III. Méthode de détermination de la sensibilité.....	22
A. Principes d'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.....	22
B. Antibiogramme (ou méthode des disques).....	22
C. Méthode de micro ou macro-dilutions.....	23
D. E-test : bandelettes.....	24
IV. Classement des bactéries selon leur sensibilité.....	25
A. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.....	25
1. Organisation.....	25
2. Clinical breakpoints ou « seuils cliniques » selon l'EUCAST.....	26
3. Valeur seuil épidémiologique (ECOFF).....	27
4. Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (VetCAST).....	27
B. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).....	27
C. Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM).....	27
D. Recueil des données de sensibilité en France.....	27
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	29
I. Contexte, matériels et méthodes.....	29
A. Contexte : le projet OVIBOOST.....	29
B. Origine et dilution des antibiotiques en vue de la détermination de la CMI.....	30
C. Préparation de la suspension bactérienne utilisée pour la détermination des CMI.....	30
1. Prélèvement et mise en culture des souches bactériennes.....	30
2. Obtention d'une suspension bactérienne et mesure de la turbidité.....	31
II. Résultats.....	32
A. Détermination de la sensibilité de <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> à l'oxytétracycline.....	32
1. Sensibilité de <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> à l'oxytétracycline.....	33
2. Effet de période sur la sensibilité à l'oxytétracycline.....	33
3. CMI et concentrations plasmatiques en oxytétracycline.....	33
B. Détermination de la sensibilité de <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> aux sulfamides : sulfadiméthoxine et sulfadiazine.....	33
1. Sensibilité de <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> aux sulfamides.....	35
2. Effet de période sur la sensibilité aux sulfamides.....	35
3. CMI et concentrations plasmatiques en sulfadiméthoxine.....	35
C. Détermination de la sensibilité de <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> au florfénicol.....	35
1. Sensibilité de <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> au florfénicol.....	36
2. Effet période sur la sensibilité au florfénicol.....	36
D. Détermination de la sensibilité de <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> à la tilmicosine.....	37
1. Sensibilité de <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> à la tilmicosine.....	37
2. Effet période sur la sensibilité à la tilmicosine.....	38

3.	CMI et concentrations plasmatiques en tilmicosine	38
E.	Détermination de la sensibilité de <i>Mannheimia hæmolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> à la fluméquine.....	38
1.	Sensibilité de <i>Mannheimia hæmolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> à la fluméquine	39
2.	Effet période sur la sensibilité à la fluméquine	39
3.	CMI et concentrations plasmatiques en fluméquine	39
F.	Effet élevage sur les pourcentages de bactéries résistantes	40
G.	Bactéries multirésistantes	40
H.	Comparaison des résistances mises en évidence dans cette étude avec celles obtenues par antibiogrammes	41
III.	Discussion	44
A.	Limite de la méthode de détermination de la CMI	44
B.	Intérêt d'une étude pharmacocinétique sur des agneaux cliniques	44
C.	Effet période ou prélèvement répété d'une même souche ?	44
D.	Fluméquine : molécule de choix selon cette étude	45
E.	D'autres alternatives à l'usage d'antibiotique dans la lutte contre la pasteurellose	45
	Conclusion	49
	Bibliographie	50

Listes des figures

Figure 1 : Répartition en France des sérotypes de <i>M.hæmolytica</i> (A1 à A12) et de <i>P.trehalosi</i> (T3 à T15) isolés sur des ovins présentant des signes cliniques de pasteurellose (137 souches) Source : (Abadie, Thiery 2006).....	16
Figure 2: Indices pharmacocinétiques et pharmacodynamiques utilisées pour les antibiotiques (Anses 2014).....	18
Figure 3 : Structure chimique du chloramphénicol, florfénicol et thiamphénicol (à noter ; le groupement fluorine en C3 du florfénicol) (Dowling 2013).....	20
Figure 4 : Gélose d'antibiogramme : les auréoles transparentes représentent les zones d'inhibition autour de chaque disque imprégné d'antibiotique (Rubin 2013b)	23
Figure 5: Schéma du principe de détermination de la CMI par la méthode de micro-dilution.....	24
Figure 6: Test de gradient : chaque bandelette graduée est imprégnée par un gradient de concentrations d'un antibiotique, les auréoles transparentes représentent les zones d'inhibition de la croissance bactérienne (Rubin 2013b)	25
Figure 7: Distribution des CMI en amoxiciline pour 5288 souches de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (EUCAST 2018b).....	26
Figure 8: Proportion de sensibilité pour les antibiotiques testés par antibiogramme contre <i>Mannheimia hæmolytica</i> (Anses 2017)	28
Figure 9: Concentrations en antibiotiques des solutions mères et gamme de concentrations testées pour déterminer les CMI	30
Figure 10: Composition du BHI (Brain Heart Infusion) (BD 2013) et du MHB pour un litre de bouillon (SIGMA-ALDRICH 2018).....	31
Figure 11: Concentrations minimales inhibitrices en oxytétracycline sur <i>Mannheimia hæmolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> , seuil clinique (CA-SFM 2017) et concentrations plasmatiques obtenues (Laffay 2017).....	32
Figure 12: Concentrations minimales inhibitrices en sulfadiméthoxime sur <i>Mannheimia hæmolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> , seuil clinique (CA-SFM 2017) et concentrations plasmatiques obtenues (Laffay 2017).....	34
Figure 13: Concentrations minimales inhibitrices en sulfadiazine et seuil clinique (CA-SFM 2017)	34
Figure 14: Concentrations minimales inhibitrices en florfénicol sur <i>Mannheimia hæmolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> et seuil clinique (CA-SFM 2017).....	36
Figure 15: Concentrations minimales inhibitrices en tilmicosine sur <i>Mannheimia hæmolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> , seuil clinique (CA-SFM, Madec, Decousser 2017) comparés aux concentrations plasmatiques obtenues (Laffay 2017)	37
Figure 16: Concentrations minimales inhibitrices en fluméquine sur <i>Mannheimia hæmolytica</i> et <i>Pasteurella multocida</i> et seuil clinique (CA-SFM 2017) comparés aux concentrations plasmatiques obtenues (Laffay 2017).....	39
Figure 17: Effet élevage sur le pourcentage de résistance pour la période avant avril 2017	40
Figure 18: Pourcentage de bactéries multirésistantes sur les 64 souches testées en fonction du nombre d'antibiotiques ciblés par la résistance	41
Figure 19: Comparaison des résultats des antibiogrammes aux résultats issus de la détermination de la CMI (S=sensible, R=résistante et I=intermédiaire)	43
Figure 20: Protocoles des vaccins OVILIS PASTOVAX et SALMOPAST (Casamitjana 2000; Petit 2013; Le Moine 2009).....	46

Listes des abréviations

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CFU ou UFC	Colony-Forming Unit
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ECOFF	Epidemiological Cut Off
VetCAST	Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ISO	International Organization for Standardization
PABA	Acide para-aminobenzoïque
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie

Introduction

En production ovine, la valorisation des agneaux se fait grâce à des ateliers d'engraissement où des animaux provenant de différents élevages naisseurs sont regroupés à partir du sevrage, à environ un mois d'âge, jusqu'à la fin de l'engraissement à 90 jours d'âge dans des bâtiments spécialisés. Ce système de production implique de nombreux facteurs de stress dus au transport, au mélange d'individus d'origines différentes, aux multiples transitions alimentaires lors de l'engraissement et à la forte densité d'individus. L'engraissement en atelier représente une période critique où les agneaux sont particulièrement exposés à la pression infectieuse. Des agents infectieux à tropisme respiratoire tels que les bactéries de type *Pasteurella spp.* souvent associées à une infection virale peuvent alors provoquer des pathologies respiratoires. En effet, la pneumonie est une des pathologies les plus courantes en atelier d'engraissement des agneaux (Natorp 2013). La chronicité de la maladie atteint l'intégrité pulmonaire ce qui a des conséquences sur l'appétit et la valorisation alimentaire et aboutit à des retards de croissance. La pasteurellose a donc un impact économique non négligeable sur la filière ovine qui est déjà peu rémunératrice par rapport aux autres productions agricoles avec en 2012 un revenu qui n'atteint que 33 % du revenu moyen de l'ensemble des exploitations agricoles françaises, soit environ 10 000 €/an (Prache et al. 2013).

Afin de prévenir ces affections, les éleveurs choisissent souvent une antibiothérapie prophylactique de tous les agneaux avec un aliment médicamenteux à base d'oxytétracycline ou chlortétracycline, sulfadimérazine ou sulfadiméthoxine pendant la phase de démarrage (Le Guen 2007). Or, l'antibioprophylaxie peut augmenter le risque de sélection de souches bactériennes résistantes parmi la flore commensale des animaux sains ou malades (Anses 2014). Dans le contexte de lutte contre l'antibiorésistance, le gouvernement a créé en 2011 un plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire appelé EcoAntibio sur la période 2012-2017. L'objectif était de réduire de 25% l'usage des antibiotiques sur 5 ans ce qui a été une véritable réussite puisque l'exposition des animaux aux antibiotiques a été diminué de 37% sur la période. Ce plan est reconduit de 2017 à 2021 et préconise un usage raisonné des antibiotiques. Il a pour but de sensibiliser les éleveurs mais aussi les vétérinaires sur les bonnes pratiques. Une utilisation systématique telle que celle pratiquée avec l'aliment médicamenteux ne correspond plus au contexte réglementaire et des alternatives doivent être adoptées.

C'est dans ce contexte qu'est né le projet OVIBOOST de recherche et développement en 2014 afin d'aider les éleveurs à « booster » les performances technico-économiques des ateliers d'engraissement du bassin de Roquefort en Aveyron. Des groupements ovins des coopératives agricoles ATERRIS et UNICOR se sont unis avec l'unité de recherche INRA/TOXALIM de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse dans le but d'établir de nouveaux protocoles d'antibiothérapie curative via l'eau de boisson. Plusieurs études pourtant sur différentes familles d'antibiotiques ont alors été mises en œuvre afin d'évaluer la possibilité d'administrer les antibiotiques dans l'eau de boisson, puis de mesurer les concentrations plasmatiques obtenues chez les agneaux lors des traitements.

Dans cette étude, la sensibilité de bactéries préalablement isolées sur les poumons d'agneaux atteints de pasteurellose à six antibiotiques a été testée. Ces antibiotiques appartiennent à cinq familles différentes : une tétracycline (l'oxytétracycline), deux sulfonamides (la sulfadiazine et la sulfadiméthoxine), un phénicolé (le florfenicol), un macrolide (la tilmicosine) et une quinolone (la fluméquine). Cette sensibilité a été évaluée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice par une méthode de micro-dilution

réalisée en laboratoire. Ces résultats ont complété les études précédentes en évaluant la résistance des bactéries testées. La comparaison entre les concentrations obtenues dans le plasma d'agneaux traités et les CMI obtenues a aussi permis de prédire l'efficacité potentielle des différents traitements administrés dans l'eau de boisson.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les principales bactéries responsables de pathologies respiratoires en atelier d'élevage

A. Pasteurellose : *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida*

Les bactéries du genre *Pasteurella* spp. sont des coccobacilles à coloration Gram négatif et font partie de la flore commensale colonisant le nasopharynx et les muqueuses buccales des mammifères. Une source de stress telle que le transport, une densité importante d'animaux, un changement de température ou de mauvaises conditions d'élevage représente un facteur prédisposant à une pasteurellose (Ozyldiz et al. 2013). Ces bactéries sont aussi à l'origine d'infection secondaire suite à l'affaiblissement du système immunitaire par différents virus à tropisme respiratoire : la peste des petits ruminants (genre morbillivirus famille *paramyxovirus*), parainfluenza 3, adenovirus et virus syncytial respiratoire ovin (PUGH 2011).

La pasteurellose est donc une affection multifactorielle et contagieuse qui atteint l'appareil respiratoire et qui peut évoluer selon différentes formes chez l'agneau. Chez les plus jeunes individus, avant l'âge de trois mois, une forme septicémique est souvent observée et est rapidement mortelle. On peut alors remarquer un jetage spumeux sanguinolent, une forte douleur thoracique et le plus souvent cette forme se traduit par une mort subite asymptomatique. Chez les agneaux un peu plus âgés, la pasteurellose évolue sous une forme aiguë à subaiguë avec des symptômes tels que l'abattement, l'hyperthermie, l'anorexie, la dyspnée accompagnée d'un jetage muco-purulent et d'une toux. Des formes plus chroniques sont possibles sur certains individus qui présentent alors un amaigrissement et un retard de croissance sévère (Casamitjana 2000).

Mannheimia hæmolytica, anciennement appelée *Pasteurella hæmolytica*, est divisée en deux biotypes : A et T. Les biotypes T ont été reclassifiés en tant que *Pasteurella trehalosi* en raison de leur capacité à utiliser le tréhalose. Ces bactéries sont présentes dans les amygdales et se multiplient à la faveur d'un stress induisant le passage dans le sang de toxines fatales à l'agneau. Elles sont responsables de formes septicémiques chez les agneaux de 2 à 12 mois. Le biotype A de *M. hæmolytica*, capable de fermenter l'arabinose, est présent dans le nasopharynx et peut être responsable de toutes les formes de pasteurelloses. Il peut atteindre les agneaux dès l'âge de 10 jours.

D'après une étude (Abadie, Thiery 2006) réalisée en France de 2000 à 2004, des sérotypages sur des ovins atteints de pasteurellose ont montré que le sérotype A2 était prépondérant à 29% et que le sérotype prépondérant de *P. trehalosi* était le type T4 pour 4,2%.

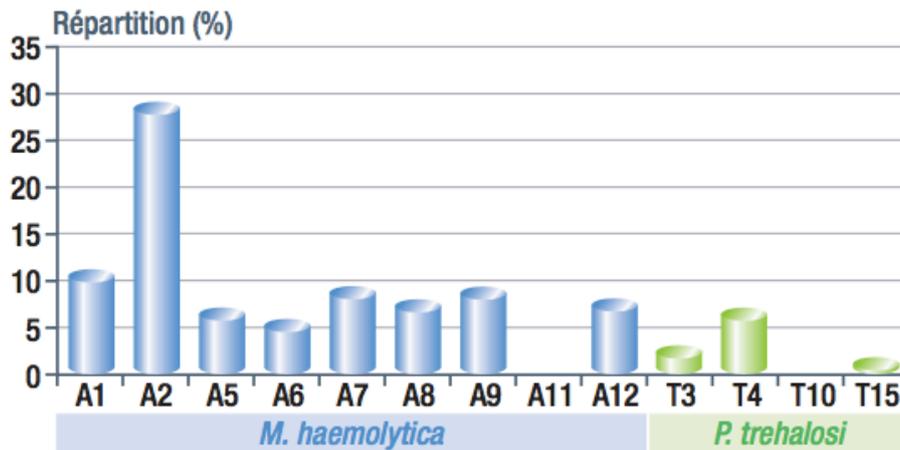


Figure 1 : Répartition en France des sérotypes de *M.haemolytica* (A1 à A12) et de *P.trehalosi* (T3 à T15) isolés sur des ovins présentant des signes cliniques de pasteurellose (137 souches) Source : (Abadie, Thiery 2006)

Le taux de mortalité peut atteindre 20% en fonction des facteurs favorisants et infectieux associés sur les agneaux et le taux de morbidité excède parfois 50% (Douart 2002) (Casamitjana 2000).

Le pouvoir pathogène de *P. multocida* est controversé. Cependant, cette bactérie est souvent isolée sur les individus présentant les symptômes de la pasteurellose (Pugh, Baird 2012). Des études montrent également que la maladie est moins aiguë qu'en présence de *M. haemolytica* mais qu'elle contribue probablement à l'incidence de la pasteurellose sur le terrain (Abadie, Thiery 2006; Odugbo et al. 2006).

B. Pneumonie ovine à *Mycoplasma ovipneumoniae*

Mycoplasma ovipneumoniae est impliqué dans la broncho-pneumonie chronique aussi appelée pneumonie atypique ou non progressive qui atteint les agneaux en atelier d'élevage avant l'âge de 12 mois. D'après une étude réalisée dans un abattoir sur des moutons atteints de pneumonie avérée, 90% des cultures bactériennes ont révélé la présence de *M. ovipneumoniae* (Sheehan et al. 2007). Comme la pasteurellose, la mycoplasmosse est une affection multifactorielle qui apparaît surtout dans les troupeaux dont la densité est forte. Des individus adultes peuvent jouer le rôle de réservoir. Les mycoplasmes s'encapsulent, échappent au système immunitaire et peuvent de cette manière coloniser le système respiratoire à long terme. La bactérie se transmet ensuite par contact direct ou via les aérosols et provoque une stase des cellules ciliées de l'appareil respiratoire augmentant la production d'exsudats. Les signes cliniques sont discrets et se manifestent par une toux chronique et une dyspnée expiratoire qui peuvent néanmoins affecter la croissance des agneaux atteints (Pugh, Baird 2012).

Cette bactérie, dépourvue de paroi, est insensible aux familles d'antibiotiques ciblant les parois bactériennes tels que les bêta-lactamines et polypeptides. Sa culture nécessite des milieux complexes, que l'on rend sélectifs par l'utilisation d'une bêta-lactamine. La formation de colonies visibles prend deux à trois semaines, cette culture est donc difficile et peu pratiquée. Les mycoplasmes, bien que représentant un des principaux pathogènes respiratoires pouvant infecter les poumons des agneaux (Goldman, Green 2009b), n'ont donc pas été intégrés dans cette étude.

II. Les antibiotiques utilisés : mécanisme d'action et de résistance

La pasteurellose ovine peut être traitée en première intention avec de l'oxytétracycline en injectable par administrations répétées sur 3 à 4 jours consécutifs à 10mg/kg/j avec une première injection en intra-veineuse puis en intra-musculaire. Une injection unique à longue action peut être pratiquée à 20mg/kg (Scott 2011). La tilmicosine est aussi utilisée pour un traitement curatif à la dose de 10mg/kg en une seule injection sous-cutanée chez les agneaux de plus de 15kg (Naccari et al. 2001). L'administration de sulfamides par voie orale dans l'eau de boisson est généralement pratiquée en association avec le triméthoprime (Pugh, Baird 2012). L'oxytétracycline, des sulfamides (la sulfadiméthoxine et la sulfadiazine), un phénicolé aussi utilisé dans le traitement de la pasteurellose ovine (le florfénicol), la tilmicosine ainsi qu'une quinolone, la fluméquine ont été testés dans cette étude.

A. Evaluer l'efficacité d'un antibiotique

1. Paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

Pour étudier l'efficacité d'un antibiotique, deux aspects essentiels de la pharmacologie sont à évaluer : la pharmacocinétique, qui est l'effet de l'organisme sur le médicament, et la pharmacodynamie, qui est l'effet du médicament sur sa cible.

La pharmacocinétique est l'étude du devenir de la molécule dans l'organisme durant les quatre phases suivantes : absorption, distribution, métabolisation et élimination. Il existe des paramètres mesurables qui décrivent la pharmacocinétique dont

- La concentration maximale plasmatique (ou C_{max}) mesurée après administration de la molécule et le T_{max} , temps auquel on atteint cette concentration dans le plasma
- L'aire sous la courbe (ou AUC) des concentrations plasmatiques en fonction du temps, c'est le paramètre révélant l'exposition globale de l'individu traité à un médicament
- La biodisponibilité (ou F) est la fraction de la dose du médicament administrée qui atteint le compartiment plasmatique sous forme inchangée
- La clairance (ou Cl) est le volume de sang épuré de la molécule par unité de temps.
- Le temps de demi-vie (ou $t_{1/2}$) est le temps nécessaire pour diviser par 2 la concentration plasmatique lorsque l'équilibre est atteint

Dans notre cas, la pharmacocinétique de la sulfadiméthoxine, l'oxytétracycline et la tilmicosine a été évaluée dans une étude précédente (Laffay 2017) après administration par voie orale en unité expérimentale ou en élevage dans l'eau de boisson à des agneaux.

La pharmacodynamie, dans le cas d'un antibiotique, est sa capacité à arrêter la croissance bactérienne (effet bactériostatique) ou à tuer les bactéries (effet bactéricide). Souvent, la pharmacodynamie est réduite à un paramètre qui est la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la concentration la plus faible en antibiotique qui permet d'arrêter la croissance bactérienne. Les trois principaux indices d'efficacité sont illustrés dans la figure 2. Le Temps $>$ CMI, la C_{max}/CMI et l'AUC/CMI correspondent de fait à une standardisation de l'exposition plasmatique à l'antibiotique, que l'on exprime relativement à la CMI, utilisée comme indicateur de la sensibilité du pathogène à l'antibiotique testé (Anses 2014).

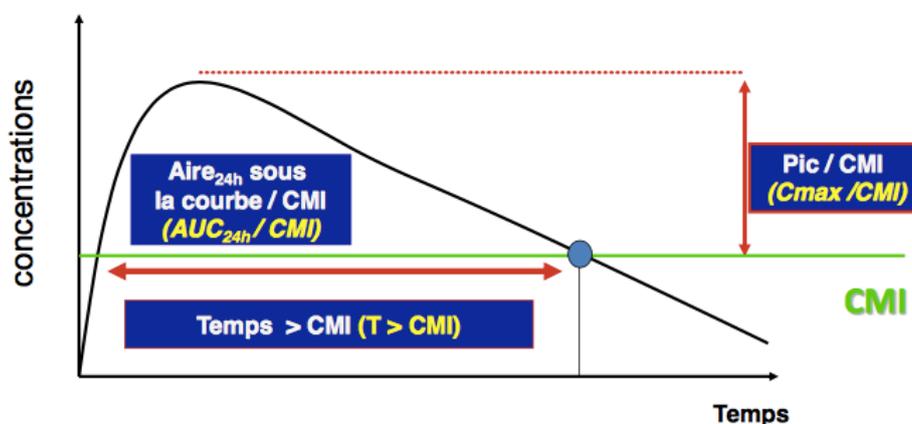


Figure 2: Indices pharmacocinétiques et pharmacodynamiques utilisées pour les antibiotiques (Anses 2014)

L'objet de cette étude est d'obtenir la CMI des principaux antibiotiques utilisés dans la gestion des pasteurelloses pour des bactéries isolées sur des agneaux en atelier d'engraissement.

2. Antibiotique temps-dépendant ou concentration-dépendant

Un autre paramètre est à prendre en compte afin de choisir l'indice qui sera le mieux corrélé à l'efficacité d'un antibiotique.

Si l'antibiotique est dit temps-dépendant, cela signifie que son action dépend essentiellement du temps d'action, on utilisera comme indice la durée pendant laquelle la concentration plasmatique est supérieure à la CMI ou $T > CMI$ que l'on exprime en pourcentage par rapport à la durée d'exposition à l'antibiotique. Dans notre étude, l'oxytétracycline, le florfenicol, les sulfonamides et la tilmicosine sont temps-dépendants.

Pour un antibiotique concentration-dépendant, l'efficacité est proportionnelle à la concentration, on utilise alors l'indice d'efficacité AUC/CMI ou C_{max}/CMI . Dans notre étude, la fluméquine est concentration-dépendante (Bousquet-Melou, Ferran, Toutain 2012).

B. Oxytétracycline

1. Classe des tétracyclines

L'oxytétracycline est une tétracycline de première génération. Les tétracyclines sont les premiers antibiotiques à large spectre découverts. Elles sont actives contre les bactéries à Gram-positif, à Gram-négatif telles que les pasteurelles mais aussi contre les mycoplasmes. Elles ont aussi une action sur des parasites tels que certains protozoaires et filaires. Ce spectre large explique leur utilisation très fréquente en médecine vétérinaire mais l'apparition de bactéries résistantes à cette classe limite aujourd'hui leur utilisation (Del Castillo 2013).

2. Mécanisme d'action

Les tétracyclines sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines par les bactéries. Elles traversent la membrane externe des bactéries à Gram négatif, via les porines OmpF et OmpC qui sont des protéines-canaux, grâce à une complexation avec le

Mg²⁺. L'acidité du périplasme permet la dissociation le complexe qui diffuse dans la membrane interne avant de se lier sur le site accepteur A de la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ce site est un site de liaison aux ARN de transfert qui amènent un groupement amino-acyl permettant la synthèse des protéines. Lorsque ce site est occupé par la tétracycline, la formation des protéines est stoppée. Les tétracyclines sont donc des antibiotiques bactériostatiques : elles ne détruisent pas les bactéries mais arrêtent leur croissance (DeMarco, Lerner 2009a).

3. Mécanismes de résistance

Cinq mécanismes de résistance ont été découverts. Les deux mécanismes suivant sont de loin les plus fréquents :

- La présence de pompe énergie-dépendante au niveau de la membrane peut jouer le rôle d'antiport et échanger un ion H⁺ extracellulaire contre un complexe tétracycline-Mg²⁺. L'antibiotique ne peut donc plus pénétrer dans la bactérie.
- Des protéines de protection du ribosome peuvent casser la liaison entre la tétracycline et le site accepteur A du ribosome.

D'autres mécanismes sont décrits : une réaction enzymatique flavine dépendante produit une hydroxylation du carbone 11a ce qui dissocie la tétracycline de son groupement β -keto-enol impliqué dans la chélation de cations et dans la liaison au ribosome. Une mutation du site de liaison de la tétracycline au ribosome ou une réduction du nombre de porines sur la membrane externe de la bactérie sont aussi des modes de résistance possibles (Del Castillo 2013).

C. Florfénicol

1. Un dérivé du thiamphénicol

Le florfénicol est un analogue structural du thiamphénicol. Le thiamphénicol a le même spectre antibactérien que le chloramphénicol mais ne possède pas le groupement *p*-nitro qui provoque une anémie aplasique chez l'homme (Dowling 2013). Pour cette raison, il peut être utilisé chez les animaux destinés à la consommation humaine, contrairement au chloramphénicol.

2. Mécanisme d'action

Comme l'oxytétracycline, le florfénicol est un inhibiteur de la synthèse des protéines bactériennes. Il se lie sur un récepteur de la sous-unité 50S du ribosome bactérien inhibant la peptidyl transférase et empêchant ainsi le transfert des acides aminés et la formation des chaînes peptidiques. La toxicité pour la moelle osseuse vient d'un mécanisme d'inhibition sur la synthèse des protéines mitochondriales des cellules de la moelle chez les mammifères (Dowling 2013). Bien que cette toxicité n'ait pas été rapportée chez les bovins et ovins, elle a été mise en évidence à partir d'une certaine dose ou à la suite d'une exposition prolongée chez l'alpaga et la gazelle de Thompson (Holmes 2012; Tuttle 2006).

3. Résistance

Le florfénicol est structurellement proche du chloramphénicol qui a le même mécanisme d'action et diffère par un groupement fluor remplaçant un groupement hydroxyl en C-3. Cette substitution rend le florfénicol moins sensible à un mécanisme de résistance très fréquent exercée par des bactéries exprimant les gènes CAT codant pour des chloramphénicol acétyltransférases. En effet, ces bactéries synthétisent des enzymes, les CAT, qui inactivent le chloramphénicol par acétylation de son groupement

hydroxyl. La molécule obtenue est incapable de se lier à la sous-unité 50S ribosomiale et devient inefficace. Les gènes CAT ont été mis en évidence sur des plasmides chez les pasteurelles. Le florfénicol, grâce à son groupement fluor, est donc moins sensible à cette forme de résistance mais d'autres mécanismes ont été identifiés. Le gène floR a été mis en évidence sur des plasmides de bactéries à Gram négatif et notamment chez les *P. multocida* isolées chez le veau (Kehrenberg, Schwarz 2005). Ce gène code pour une protéine transmembranaire servant à exporter le florfénicol de la cellule (Schwarz et al. 2004).

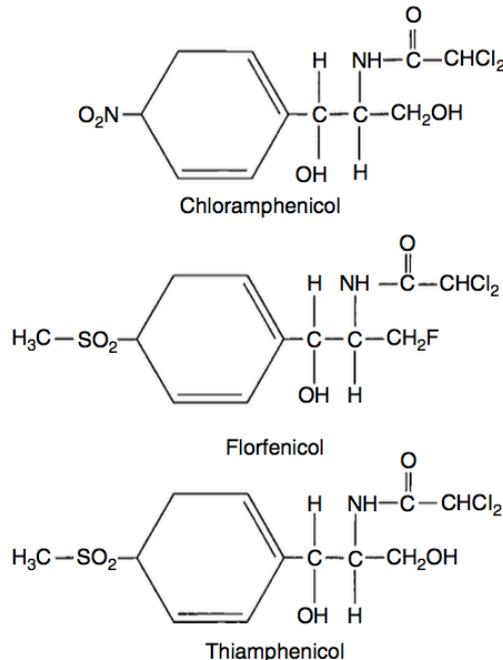


Figure 3 : Structure chimique du chloramphénicol, florfénicol et thiamphénicol (à noter ; le groupement fluorine en C3 du florfénicol) (Dowling 2013)

D. Sulfadiazine/sulfadiméthoxine

1. Classe des sulfamides

La sulfadiazine et la sulfadiméthoxine sont des antibiotiques à large spectre de la famille des sulfamides. Elles diffèrent de part leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques mais partagent le même mécanisme d'action qui concerne la synthèse de l'acide folique. La sulfadiméthoxine et la sulfadiazine sont surtout utilisées en médecine vétérinaire et la sulfadiméthoxime est connue pour son action prolongée dans le temps. Les sulfamides peuvent s'utiliser seuls ou combinés au triméthoprime qui agit sur la même voie de synthèse de l'acide folique et diminue la fréquence d'apparition des résistances (Prescott 2013).

2. Mécanisme d'action

Les sulfamides sont des analogues structuraux de l'acide para-aminobenzoïque (PABA) qui est le substrat naturel de la dihydroptéroate synthétase dans la chaîne de réaction de la biosynthèse du dihydrofolate, une molécule issue de l'acide folique. Le dihydrofolate est le substrat d'une autre enzyme, la dihydrofolate reductase, qui permet de produire le tétrahydrofolate, une co-enzyme essentielle à la synthèse des bases nucléiques et donc du matériel génétique de la bactérie. Le triméthoprime (TMP) est un inhibiteur de cette dernière enzyme ce qui permet un blocage séquentiel de la synthèse

du tétrafolate. Cela explique l'association fréquente des sulfamides au TMP (DeMarco, Lerner 2009b).

Les sulfamides étant des analogues structurels de PABA, l'effet bactériostatique des sulfamides peut être reversé par un excès de PABA ce qui est notamment le cas dans le pus (Prescott 2013).

3. Résistance

Les mécanismes de résistance sont documentés en particulier sur des bactéries isolées chez des animaux de production. Ils sont dû à la propagation horizontale de gènes exprimant des variants de l'enzyme cible dihydropteroate synthétase insensible aux sulfamides. Deux gènes ont été identifiés : *sul1* et *sul2*. Ils sont portés par des transposons et des plasmides et expriment des dihydropteroate hautement résistantes aux sulfamides. Ils sont souvent trouvés en proportion égale dans une population de bactéries à Gram négatif résistante aux sulfamides.

Il existe aussi de nombreux mécanismes de résistance régis par des gènes trouvés sur le chromosome bactérien. Par exemple, un gène folP codant pour l'enzyme bactérienne dihydropteroate synthétase ayant reçu une mutation par substitution d'une paire de bases a été identifié chez une bactérie *Escherichia coli* montrant une résistance aux sulfamides. Cette mutation a pu modifier l'affinité de l'enzyme pour les sulfamides et donc diminué son action inhibitrice. D'autres mécanismes trouvés sont plus complexes et impliquent des échanges par transformation et recombinaison de gènes entiers ou partiels formant des gènes en mosaïques (Prescott 2013; Skold 2001).

4. Sulfamides et CMI

La CMI des sulfamides est fortement influencée par la composition du milieu et la densité bactérienne. Les résultats des tests *in vitro* ne sont donc pas toujours fiables. On considère néanmoins qu'une CMI comprise entre 8 et 32µg/ml permet de prédire une sensibilité des bactéries pour les sulfamides à action courte (Prescott 2013).

E. Tilmicosine

1. Classe des macrolides

La tilmicosine fait partie des macrolides qui sont des macrocycles de lactone associés à des sucres neutres ou aminés. On les classe selon le nombre de carbones qui constituent leur cycle. La tilmicosine en contient 16 et est un dérivé semi-synthétique. Les macrolides ont une bonne diffusion dans les tissus ainsi que dans les cellules (Giguère 2013).

2. Mécanisme d'action

La tilmicosine est un inhibiteur de la synthèse des protéines en se fixant de façon réversible à la sous-unité 50S du ribosome mais le site de liaison sur l'unité 23S de l'ARN ribosomal est différent de celui du florfenicol. Son action est bactériostatique jusqu'à une certaine concentration au-delà de laquelle l'effet peut être bactéricide. Les bactéries à Gram positif et Gram négatif telles que les pasteurelles sont souvent sensibles à la tilmicosine (Giguère 2013).

3. Résistance

La majorité des bactéries résistantes acquièrent la capacité d'ajouter des groupements méthyl à l'ARN ribosomal empêchant ainsi la liaison de la tilmicosine sur son site d'action.

Certaines bactéries sont aussi capables d'exporter la molécule hors de leur cytoplasme. Le troisième mécanisme de résistance consiste en l'inactivation enzymatique des macrolides mais il est moins fréquent et n'est pas clairement établi (Giguère 2013).

F. Fluméquine

1. Classe des quinolones

La fluméquine est un agent antimicrobien synthétique bactéricide de la famille des quinolones. Plus précisément, la fluméquine est une quinolone de première génération c'est-à-dire qu'elle est active contre la plupart des bactéries à Gram négatif sauf les *Pseudomonas spp* (Giguère, Dowling 2013).

2. Mécanisme d'action

La fluméquine est un inhibiteur de la réplication du chromosome bactérien. Ses deux principales cibles sont : l'ADN-gyrase, une protéine spécifique des bactéries, et la topoisomérase IV. Ces enzymes catalysent la coupure des deux brins d'un segment d'ADN, pour permettre la traversée par un autre segment d'ADN (DeMarco, Lerner 2009a).

3. Résistance

Les mécanismes de résistance connus contre les quinolones concernent des modifications des cibles, une modification de la perméabilité membranaire ou l'exportation de la molécule en dehors de la bactérie (Giguère, Dowling 2013).

III. Méthode de détermination de la sensibilité

Afin d'évaluer la pharmacodynamie des antibiotiques, différentes méthodes de détermination de la sensibilité de bactérie pour un antibiotique donné sont utilisées.

A. Principes d'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

Le but de ces différentes méthodes de test est d'obtenir *in vitro* des informations permettant d'adapter et d'optimiser les traitements antimicrobiens *in vivo*. Il existe deux types de test : des tests qualitatifs ou quantitatifs. Les tests qualitatifs tels que l'antibiogramme qui classe la bactérie isolée de l'individu malade comme étant sensible, intermédiaire ou bien résistante à un antibiotique permettent d'aiguiller le clinicien dans le choix de son antibiothérapie ou de corriger un choix thérapeutique empirique n'ayant pas fonctionné. Dans le cas où une idée plus précise de la concentration en molécule antimicrobienne est nécessaire pour assurer une efficacité optimale, une méthode quantitative telle que la détermination de la concentration minimale inhibitrice peut être mise en place.

B. Antibiogramme (ou méthode des disques)

Cette méthode est qualitative, elle consiste à mesurer le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne par la diffusion d'antibiotique depuis un disque dans un milieu solide (géluse).

Le diamètre de la zone d'inhibition dépend de différents facteurs : la capacité de diffusion de l'antibiotique et sa concentration, l'épaisseur du milieu et enfin la sensibilité de la bactérie vis-à-vis de la molécule (Rubin 2013a). Pour réduire ces facteurs de variation, la méthode a été standardisée par le Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI) et régulièrement réactualisée. Cette méthode préconise l'utilisation d'un gel d'agar de 4mm d'épaisseur et de disques de papier imprégnés de quantités d'antibiotiques standardisées.

Les géloses sont ensemencées par une suspension contenant la bactérie à tester. La turbidité de cette suspension est de 0,5 McFarland et contient environ $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL (Rubin 2013a).

Les disques imprégnés d'antibiotique sont ensuite déposés sur les géloses qui sont incubées à 35°C pendant 18 h. Le diamètre de la zone d'inhibition est alors mesuré autour de chaque antibiotique (Wanger 2009a).

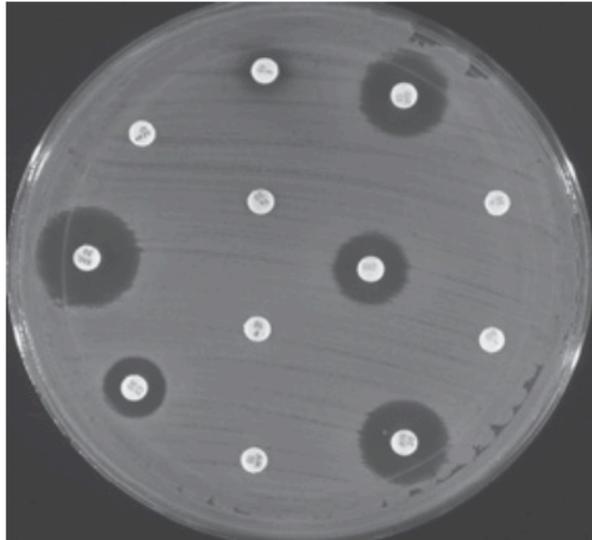


Figure 4 : Gélose d'antibiogramme : les auréoles transparentes représentent les zones d'inhibition autour de chaque disque imprégné d'antibiotique (Rubin 2013b)

Ce test est simple à réaliser et peu coûteux mais il permet seulement de catégoriser les bactéries selon trois qualificatifs : sensible, intermédiaire ou résistant vis-à-vis d'un antibiotique.

C. Méthode de micro ou macro-dilutions

Cette méthode permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) c'est-à-dire la plus faible concentration en antibiotique permettant l'arrêt de la croissance bactérienne (Rubin 2013b). Une exception est faite pour les sulfamides et triméthoprime où la CMI est la plus faible concentration pour réduire de 80% la croissance bactérienne comparée au milieu témoin sans antibiotique. Ceci s'explique par la présence d'antagonistes dans le milieu permettant une faible croissance (CLSI 2009).

Les différentes concentrations de l'antibiotique obtenues par dilution peuvent être contenues dans des tubes, c'est la méthode de macro-dilution, ou bien sur une plaque 96 puits, on parle alors de la méthode de micro-dilution.

Dans cette étude, la méthode de micro-dilution a été utilisée. Une plaque de 96 puits peut servir à la détermination de la CMI de huit antibiotiques au maximum vis-à-vis de la même souche. Chaque ligne correspond à un antibiotique et contient 12 puits (Figure 4). Les deux derniers puits servent de contrôles positifs et négatifs de la croissance des bactéries.

Dans le premier puits, est déposée une solution mère d'antibiotique à une concentration donnée. Cette solution mère est diluée de deux en deux jusqu'au 10^{ème} puits.

Après incubation, on observe un dépôt dans le fond de certains puits correspondant à la croissance bactérienne. La CMI correspond à la concentration en antibiotique du premier puits ne présentant pas de croissance bactérienne.

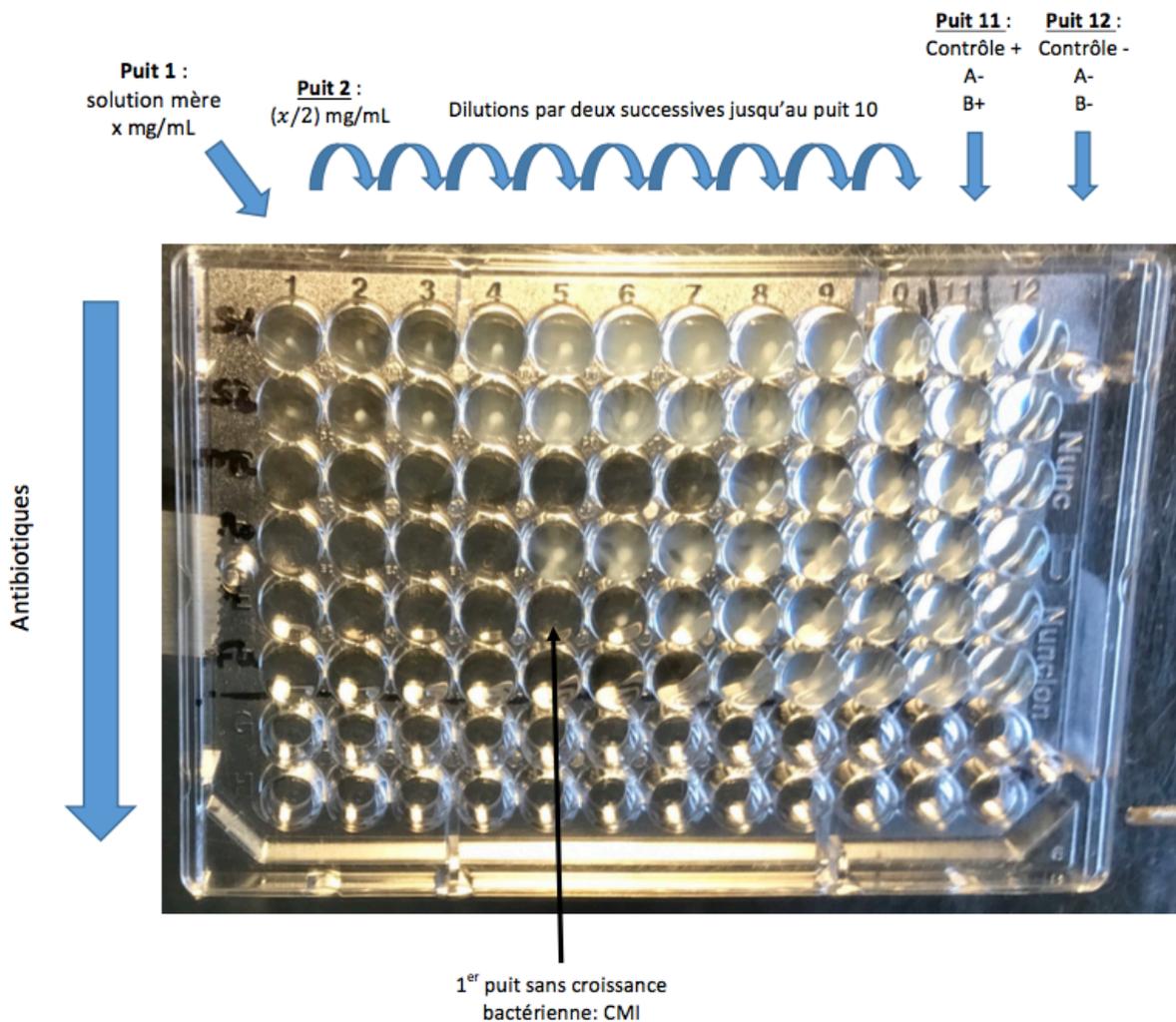


Figure 5: Schéma du principe de détermination de la CMI par la méthode de micro-dilution

D. E-test : bandelettes

Le E-test ou test de gradient ressemble à l'antibiogramme, il se fait sur plaque d'agarensemencée par la bactérie à tester. Une bandelette pré-imprégnée par un gradient en concentrations d'antibiotique est alors placée sur la plaque, l'extrémité la plus concentrée étant sur la partie externe de la plaque. Cette bandelette est préparée avec des concentrations couvrant 15 dilutions de la CMI de référence. L'antibiotique en contact avec l'agar diffuse et le gradient se maintient jusqu'à 18 - 20h dans le milieu selon l'antibiotique ce qui laisse le temps à la plupart des bactéries pour croître. Après incubation, l'intersection entre la zone où les bactéries ne peuvent plus croître et la bandelette permet de déterminer la CMI qui correspond à la concentration indiquée sur la bandelette graduée (Wanger 2009b).



Figure 6: Test de gradient : chaque bandelette graduée est imprégnée par un gradient de concentrations d'un antibiotique, les auréoles transparentes représentent les zones d'inhibition de la croissance bactérienne (Rubin 2013b)

L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'obtenir une CMI avec une méthode facile à mettre en œuvre (moins de manipulations que pour les méthodes dilutions en bouillon). Elle est connue pour détecter des faibles niveaux de résistances. Cependant, elle est rarement utilisée compte tenu de son coût élevé puisqu'il faut acheter des bandelettes à usage unique pour chaque antibiotique (Rubin 2013b).

IV. Classement des bactéries selon leur sensibilité

A. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

1. Organisation

L'EUCAST est un organisme européen qui établit les méthodes standards de détermination de la sensibilité aux antimicrobiens afin d'harmoniser les données ainsi que les seuils de CMI servant à interpréter la sensibilité d'une population bactérienne. Il a été fondé en 1997 et depuis quelques années, il fournit les normes à suivre en matière d'interprétation des CMI et de classement des bactéries en tant que sensible, résistantes ou intermédiaires. L'EUCAST rassemble des valeurs de CMI pour toutes les bactéries et antimicrobiens et crée des graphiques de distribution de CMI comme dans l'exemple donné dans la figure 7. Pour les interpréter, l'EUCAST a défini des valeurs seuils standards pour chaque bactérie et chaque antibiotique testés (EUCAST 2018a).

Amoxicillin / *Streptococcus pneumoniae*
International MIC Distribution - Reference Database 2018-04-10

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance

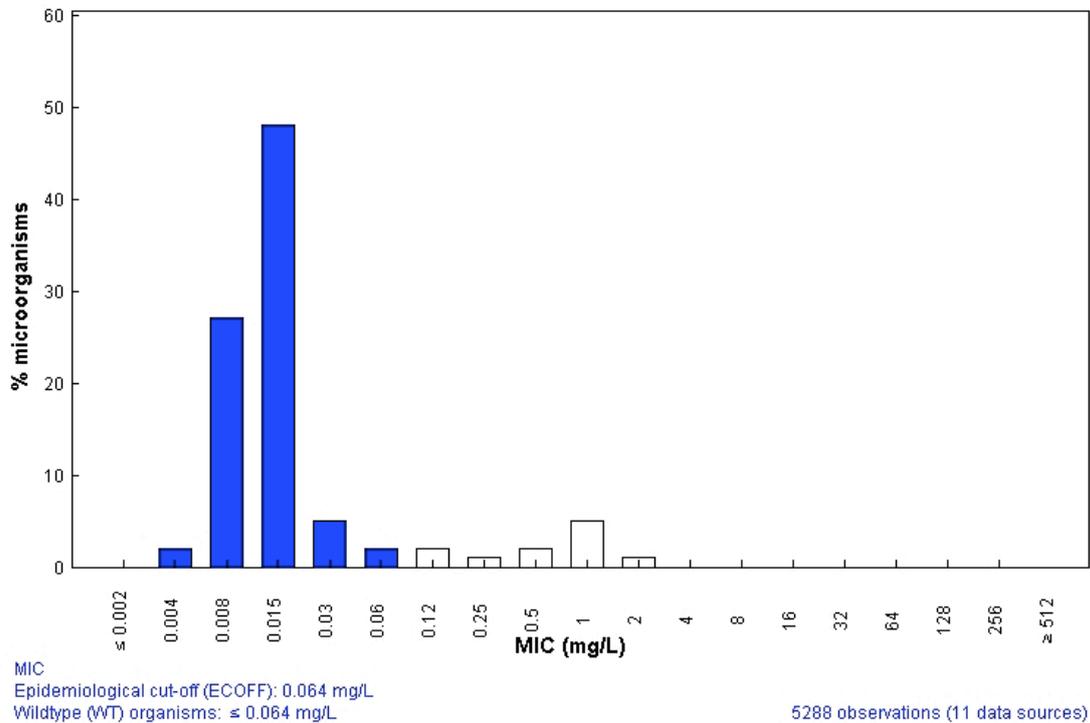


Figure 7: Distribution des CMI en amoxicilline pour 5288 souches de *Streptococcus pneumoniae* (EUCAST 2018b)

2. Clinical breakpoints ou « seuils cliniques » selon l'EUCAST

Les seuils cliniques pour une espèce bactérienne donnée définissent trois catégories selon la diamètre d'inhibition ou de la valeur de CMI : cliniquement sensible (S), cliniquement intermédiaire (I) et cliniquement résistante (R). Ces trois définitions respectent des critères précis :

- Pour un micro-organisme classé sensible (S), un fort taux de succès thérapeutique est prédit avec l'utilisation de cet antibiotique
- Il est classé intermédiaire (I) si l'effet antimicrobien est associé à un succès thérapeutique incertain
- Il est classé résistante (R) si l'effet antimicrobien est associé à une prédiction d'un fort taux d'échec thérapeutique

Dans les trois cas, les bactéries sont catégorisées selon des seuils appropriés sur une population testée *in vitro*. Ils peuvent être consultés librement sur le site de l'EUCAST pour chaque bactérie et chaque antibiotique. Ces valeurs sont déterminées en prenant en compte la pharmacocinétique de l'antibiotique, les mécanismes de résistance de l'espèce bactérienne et la distribution des CMI. Ces données viennent de données récoltées dans le monde entier et représentent 30 000 distributions de CMI. L'essentiel de ces données proviennent de la médecine humaine (EUCAST 2018c).

3. Valeur seuil épidémiologique (ECOFF)

La valeur seuil épidémiologique est une valeur de CMI séparant deux types de bactéries : les bactéries dites sauvages ou wild-type (WT) et les bactéries résistantes ou non sauvages (Non-Wild Type NWT). Selon l'EUCAST, les bactéries WT sont définies comme des bactéries n'ayant pas acquis de mécanisme de résistance à l'antibiotique en question. Par opposition, les bactéries NWT ont un mécanisme de résistance à la molécule. Ces définitions sont indépendantes du fait que les bactéries répondent ou non cliniquement au traitement antimicrobien (EUCAST 2018d).

4. Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (VetCAST)

Il existe une branche vétérinaire de l'EUCAST appelée VetCAST depuis 2015 qui collecte les données de sensibilité sur des bactéries pathogènes d'origine animale et des bactéries animales à risque zoonotique.

Ces données ont été ou seront ensuite comparées aux données de pharmacocinétique de l'antibiotique chez les animaux traités pour déterminer des seuils cliniques qui seront ensuite disponibles en libre accès pour les antibiotiques à usage vétérinaire (EUCAST 2018e).

B. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Comme mentionné précédemment, le CLSI est un organisme américain dont le but est d'établir des consensus et des méthodes standards dans la pratique clinique et de laboratoire et de promouvoir leur usage à l'international. Ces consensus concernent de nombreux domaines dont la microbiologie fait partie. Il en ressort des lignes directrices dans les procédés de laboratoire à rayonnement global ce qui facilite l'harmonisation des résultats. Le CLSI participe au développement de standards internationaux comme ceux des normes de l'International Organisation for Standardization (ISO).

Le CLSI fournit également les normes pour la médecine vétérinaire en matière de détermination de la sensibilité des bactéries aux antimicrobiens mais aussi dans le contrôle qualité de ces méthodes. Ces normes sont mises à jour régulièrement (CLSI 2018).

C. Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM)

La société française de microbiologie fournit des traductions en français de l'EUCAST (SFM 2018).

Il existe dans le CA-SFM, un sous-groupe vétérinaire qui décrit les méthodologies et critères d'interprétation pour les bactéries d'intérêt vétérinaire.

D. Recueil des données de sensibilité en France

Au sein de l'ANSES, le réseau vétérinaire Résapath assure la surveillance de l'antibiorésistance en médecine vétérinaire. Il collecte les données des antibiogrammes des bactéries pathogènes pour les animaux en France. Ces antibiogrammes sont généralement demandés en routine par des vétérinaires praticiens et les résultats, récoltés par les laboratoires participant au réseau, servent à évaluer la résistance des bactéries aux antibiotiques utilisés en France et à suivre l'évolution des résistances au cours du temps (Anses 2018).

Selon le bilan 2016 de Résapath, en ce concerne les ovins, *Mannheimia haemolytica* ne présentait pas de résistance majeure aux antibiotiques classiquement utilisés et testés par antibiogramme.

Pour les antibiotiques étudiés ici ou les molécules s'en rapprochant, les proportions de sensibilité trouvées dans les résultats d'antibiogramme étaient les suivantes (Anses 2017):

Antibiotique	Nombre d'antibiogramme	Pourcentage de sensibilité (%)
Tétracycline (à comparer à l'oxytétracycline)	111	87
Triméthoprime-sulfamides	112	96
Florfénicol	105	99
Acide nalidixique (quinolone comme la fluméquine)	96	93

Figure 8: Proportion de sensibilité pour les antibiotiques testés par antibiogramme contre *Mannheimia haemolytica* (Anses 2017)

Comme le montre le tableau de la figure 8, les pourcentages de sensibilité sont très bons pour la plupart des antibiotiques ou apparentés testés dans cette étude.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Contexte, matériels et méthodes

A. Contexte : le projet OVIBOOST

Le OVIBOOST est un projet de recherche et développement en conditions réelles de production qui a démarré en décembre 2014 grâce aux groupements ovins des coopératives agricoles ARTERRIS et UNICOR et à deux unités mixtes de recherche de l'INRA et de l'ENVT (IHAP et TOXALIM). Ce projet, financé entre autre par le Fonds Unique Interministériel et la région Occitanie, vise à « booster » les performances technico-économiques de la filière ovine, notamment en atelier d'engraissement d'agneaux du bassin de Roquefort.

En effet, la filière production ovine rencontre des difficultés majeures telles qu'un manque de compétitivité face aux concurrents étrangers à laquelle s'ajoute de nouvelles règles en matière d'usage des antibiotiques. Le plan Ecoantibio 2012-2017 par exemple, préconise une utilisation raisonnée des antibiotiques se traduisant par (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt 2017):

- des objectifs quantitatifs : la réduction de 25% de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire en 5 ans en utilisant seulement les quantités appropriées strictement nécessaires qui sont prescrites et administrées à l'animal

- des objectifs qualitatifs en réduisant l'utilisation des antibiotiques dits critiques en médecine vétérinaire tels que les fluoroquinolones et les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération

Pour répondre à ces objectifs, une partie du projet OVIBOOST vise à établir un plan de conduite pour l'élevage des agneaux sevrés en réduisant et en optimisant le recours aux antibiotiques. L'objectif de l'unité de recherche TOXALIM INRA/ENVT était d'évaluer l'intérêt d'administrer l'antibiotique via l'eau de boisson pour permettre des traitements non systématiques, raisonnés et ciblés. En effet, les traitements antibiotiques prophylactiques administrés dans l'alimentation en début d'engraissement exposent aussi bien les agneaux sains que malades aux antibiotiques. Or, les pasteurelles sont des bactéries commensales qui colonisent le système respiratoire de tous les animaux. En traitant massivement sur un mode prophylactique, le risque de sélection de bactéries résistantes est accru. De plus, les aliments médicamenteux sont souvent produits en grandes quantités ce qui incite à leur consommation sur une durée plus longue que nécessaire.

Pour le projet OVIBOOST, l'unité TOXALIM a d'abord sélectionné les antibiotiques les plus solubles dans l'eau puis a déterminé les paramètres pharmacocinétiques de ces antibiotiques en laboratoire et en atelier d'engraissement (Laffay 2017). Suite à l'obtention des concentrations d'antibiotiques dans le plasma d'agneaux traités via l'eau de boisson, il est apparu intéressant de vérifier si les concentrations atteintes étaient capables de tuer les bactéries pathogènes. Il a donc été décidé de déterminer la sensibilité des bactéries pathogènes isolées dans les poumons d'animaux morts ou euthanasiés en raison d'une infection pulmonaire en élevage à six antibiotiques sélectionnés. Ces antibiotiques ont été identifiés au début du projet OVIBOOST par les vétérinaires des groupements comme les plus fréquemment utilisés lors de pneumonie à l'engraissement. Toutes les études de dilution et de PK ont été menées sur ces antibiotiques.

B. Origine et dilution des antibiotiques en vue de la détermination de la CMI

Toutes les antibiotiques utilisés dans cette étude ont été achetés chez Sigma-Aldrich, France sauf la tilmicosine qui a été gracieusement fournie par le laboratoire HUVEPHARMA et le florfénicol fourni par CEVA

Ces antibiotiques sous forme de poudre ont été dilués dans de l'eau distillée afin d'obtenir une solution mère I comme indiqué dans le tableau de la figure 9. Pour la sulfadiméthoxine, la sulfadiazine et la fluméquine de la soude a été ajoutée pour favoriser la dilution. Pour la tilmicosine, du méthanol a été ajouté. Pour le florfénicol, de l'éthanol à 95% a été ajouté. Pour l'oxytétracycline, de l'acide chlorhydrique a été ajouté. Puis, cette solution mère I a été diluée dans du bouillon Mueller-Hinton (ou MHB), le bouillon standard pour les déterminations de CMI dont la composition est décrite dans le tableau de la figure 10.

Les gammes de concentrations testées ont été choisies autour de la CMI₅₀ décrite pour les Pasteurelles.

Antibiotique	Solution mère I	Gamme de concentrations testées
Sulfadiméthoxine	2mg/mL	1024µg/mL
Sulfadiazine	0,5mg/mL	256 µg/mL
Oxytétracycline	0,5mg/mL	64 µg/mL
Florfénicol	0,5mg/mL	32 µg/mL
Tilmicosine	0,5mg/mL	128 µg/mL
Fluméquine	0,5mg/mL	16 µg/mL

Figure 9: Concentrations en antibiotiques des solutions mères et gamme de concentrations testées pour déterminer les CMI

Sur la plaque 96 puits, 100 µL de MHB ont été déposés dans les puits de 1 à 11 et 200 µL de MHB dans le puits 12 qui est le témoin négatif sans antibiotique et sans bactérie témoignant d'une éventuelle contamination. Ensuite, 100 µL de solution d'antibiotique ont été ajoutés au puits 1 et des dilutions successives au ½ ont été réalisées en prélevant 100µL du premier puit et en les ajoutant au 2^{ème} ainsi de suite jusqu'au 10^{ème} puits.

C. Préparation de la suspension bactérienne utilisée pour la détermination des CMI

1. Prélèvement et mise en culture des souches bactériennes

Les bactéries utilisées dans cette étude ont été isolées sur des agneaux morts après avoir exprimés des signes de maladie respiratoire au sein de quatre élevages différents dans le sud-ouest de la France. Les souches ont été récupérées auprès du laboratoire

d'analyses Aveyron Labo et du laboratoire départemental du Tarn avant d'être stockées au laboratoire TOXALIM.

- Un lot de 6 souches bactériennes prélevées durant l'automne 2015
- Un lot de 8 souches prélevées durant l'hiver 2016
- Un lot de 24 souches prélevées de la fin de l'hiver jusqu'au mois de juillet 2016
- Un lot de 15 souches prélevées du printemps jusqu'au mois d'avril 2017
- Un lot de 11 souches prélevées entre avril et juillet 2017

Au total, 64 souches bactériennes ont été testées dont : 43 *Mannheimia haemolytica* soit 67%, 20 *Pasteurella multocida* soit 31% et une *Pasteurella trehalosi* soit 2%.

Chaque souche a étéensemencée sur une gélose composée d'un bouillon de culture de type cœur-cerveille ou BHI (Brain Heart Infusion) dont la composition est détaillée sur le tableau ci-dessous :

Composition du BHI (g)		Composition du MHB (g)	
Infusion cœur-cerveille (matières solides)	8,0	Hydrolysate acide de caséine	17,5
Digestion peptidique de tissu animal	5,0	Infusion de viande	2,0
Digestion pancréatique de caséine	16,0		
Chlorure de sodium	5,0	Amidon	1,5
Glucose	2,0		
Phosphate d'hydrogène disodique	2,5		
Gélose	13,5		

Figure 10: Composition du BHI (Brain Heart Infusion) (BD 2013) et du MHB pour un litre de bouillon (SIGMA-ALDRICH 2018)

Le BHI a été choisi car il est plus riche que le MHB et permet la croissance bactérienne même si le nombre de bactérie est faible à cause du transport et des cycles de décongélation-recongélation. Les bactéries ont été incubées à 37°C pour la nuit.

2. Obtention d'une suspension bactérienne et mesure de la turbidité

Si la croissance était suffisante, pour chaque souche, quelques colonies de bactéries étaient diluées dans 3mL de bouillon MHB.

Afin d'obtenir des suspensions homogènes pour tester les antibiotiques, la turbidité de la suspension a été mesurée grâce à un spectrophotomètre et les colonies ont été diluées

jusqu'à obtenir une densité optique à 600nm comprise entre 0,06 et 0,08 correspondant environ à $5 \cdot 10^7$ UFC/mL

Puis 50 μ L de cette suspension a été diluée dans 4950 μ l de Mueller-Hinton pour obtenir la suspension bactérienne finale à $5 \cdot 10^5$ UFC/mL.

Enfin, 100 μ L de suspension bactérienne a été ajoutée aux puits 1 à 11 de la plaque préalablement remplis avec les dilutions successives d'antibiotiques, le 11^{ème} puit étant le témoin positif sans antibiotique permettant de vérifier la présence et la croissance de bactéries.

Chaque plaque correspondant à une souche bactérienne testée pour les 6 antibiotiques a été placée à l'étuve pour la nuit à 35°C. Les CMI ont été lues le lendemain matin. La CMI était la concentration la plus faible en antibiotique pour laquelle aucune croissance (aucun trouble) n'était visible à l'œil nu.

II. Résultats

A. Détermination de la sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* à l'oxytétracycline

La figure 11 représente les CMI en oxytétracycline obtenues avec les 64 souches testées.

Selon la CA-SFM, le seuil clinique de sensibilité se situe à 4 μ g/mL. En dessous de celui-ci, les bactéries sont donc considérées comme étant sensibles.

Les concentrations plasmatiques en oxytétracycline ont été obtenue sur 100 agneaux traités en atelier d'engraissement via l'eau de boisson. La posologie choisie est 2,5 fois plus importante que celle recommandée sur le résumé des caractéristiques du produits choisi soit ici 25mg/kg/12h d'oxytétracycline sous forme de Primox® pendant 4 jours. Des prises de sang quotidiennes ont été effectuées. Les concentrations plasmatiques en oxytétracycline obtenues au 4^{ème} jour sont encadrées en rouge ci-dessous :

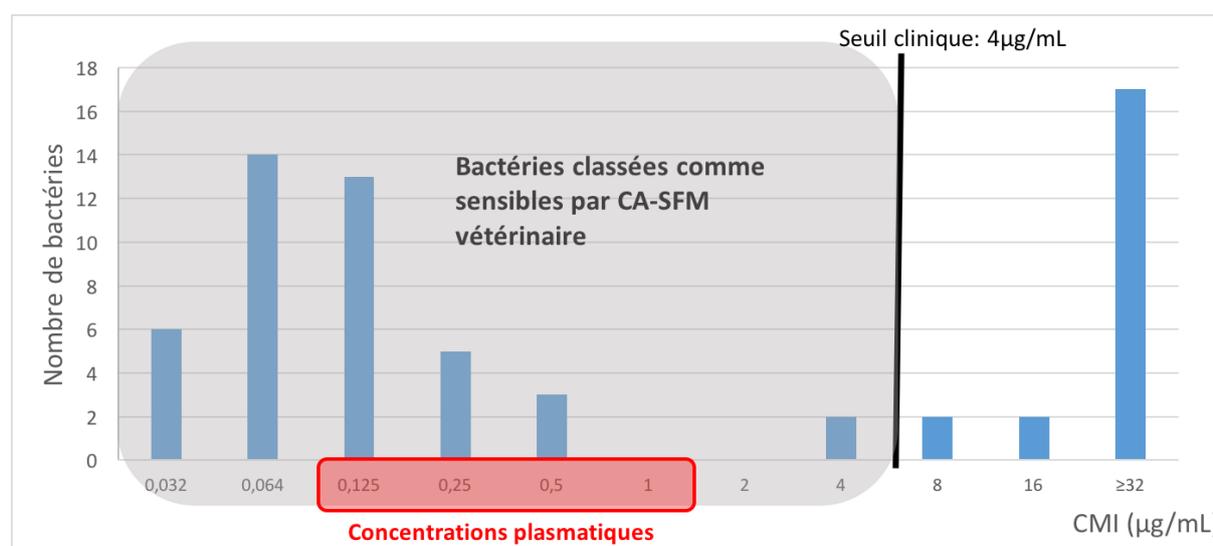


Figure 11: Concentrations minimales inhibitrices en oxytétracycline sur *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida*, seuil clinique (CA-SFM 2017) et concentrations plasmatiques obtenues (Laffay 2017)

1. Sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* à l'oxytétracycline

La répartition des CMI bactéries est bimodale, suggérant une population ayant développé un mode de résistance et une population sensible autour de 0,064µg/mL.

Dans notre cas, 67,2% des bactéries étaient sensibles à l'oxytétracycline.

2. Effet de période sur la sensibilité à l'oxytétracycline

Période (nombre de souches testées)	Pourcentage de résistance (%)
Automne 2015 (6)	0
Hiver 2016 (8)	50,0
Printemps 2016 (24)	50,0
Avant avril 2017 (15)	6,7
Avril-juillet 2017 (11)	40,0

Ces pourcentages montrent qu'il y a probablement un effet période avec une résistance apparemment inexistante en automne 2015 puis touchant la moitié des souches prélevées en hiver et printemps 2016.

3. CMI et concentrations plasmatiques en oxytétracycline

On remarque que 64,1% des bactéries testées ont une CMI inférieure ou égal aux concentrations retrouvées dans le plasma (Laffay 2017). Le traitement à l'oxytétracycline par voie orale permettrait donc de lutter contre une majorité de bactéries. Cependant, comme le montre la répartition bimodale des CMI et l'effet période marqué, des populations de bactéries résistantes peuvent se développer à certaines périodes et pourraient amener à un échec thérapeutique.

B. Détermination de la sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* aux sulfamides : sulfadiméthoxine et sulfadiazine

La figure 12 montre la répartition des CMI en sulfadiméthoxine pour les 64 souches bactériennes testées.

Selon la CA-SFM, les bactéries sont sensibles en dessous du seuil clinique égal à 64µg/mL pour les sulfamides quelle que soit la molécule.

Sur ce graphique, ont été rapportées les concentrations plasmatiques retrouvées sur 100 agneaux traités en atelier d'engraissement en suivant le protocole suivant : 55,68 mg/kg de sulfadiméthoxine (Emerecid®) le premier jour puis 27,84mg/kg par jour pendant 3 jours distribué dans l'eau de boisson. La dose de charge au premier jour de traitement a été choisie pour avoir des concentrations en sulfadiméthoxine plus stable au cours du temps et pour avoir une bonne exposition des agneaux dès le début du traitement. En effet, une première étude avait montré une augmentation des concentrations au cours du

traitement avec des concentrations très basses les 2 premiers jours de traitement. Des prélèvements sanguins ont été effectués et les concentrations plasmatiques en sulfadiméthoxine ont été mesurées. Leurs valeurs sont encadrées en rouge ci-dessous.

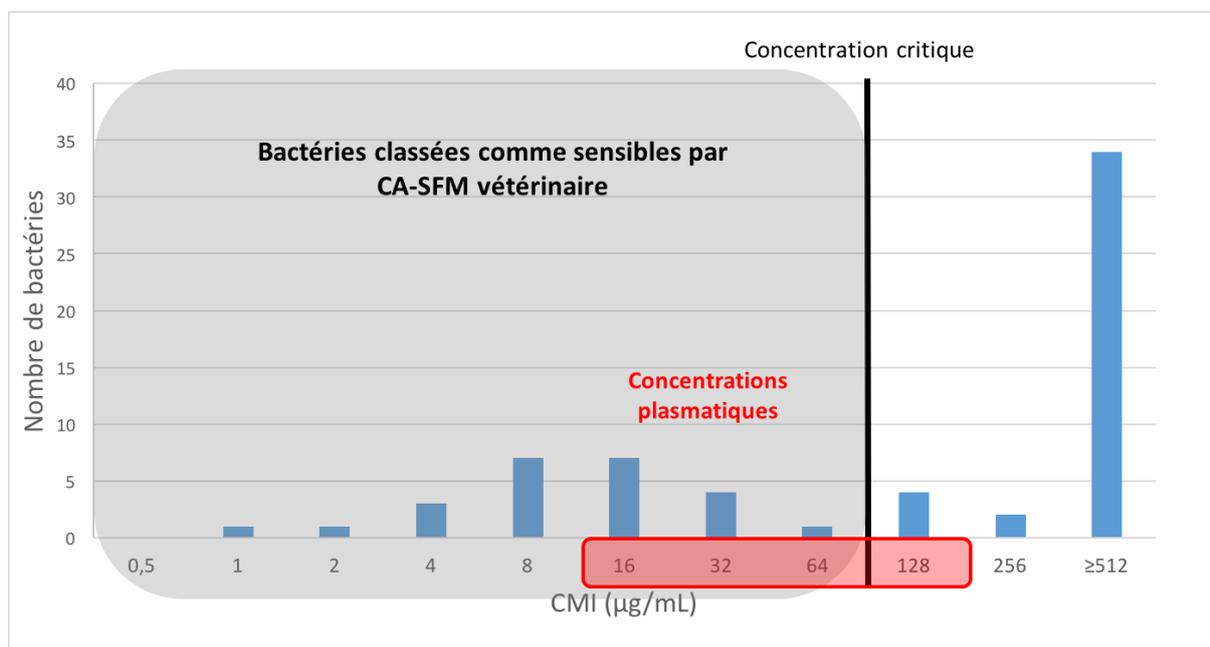


Figure 12: Concentrations minimales inhibitrices en sulfadiméthoxime sur *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*, seuil clinique (CA-SFM 2017) et concentrations plasmatiques obtenues (Laffay 2017)

La répartition des CMI en sulfadiazine est rapportée sur la figure 13. Pour la sulfadiazine, l'étude des concentrations plasmatiques suite à une administration dans l'eau de boisson sur le terrain n'a pas été faite.

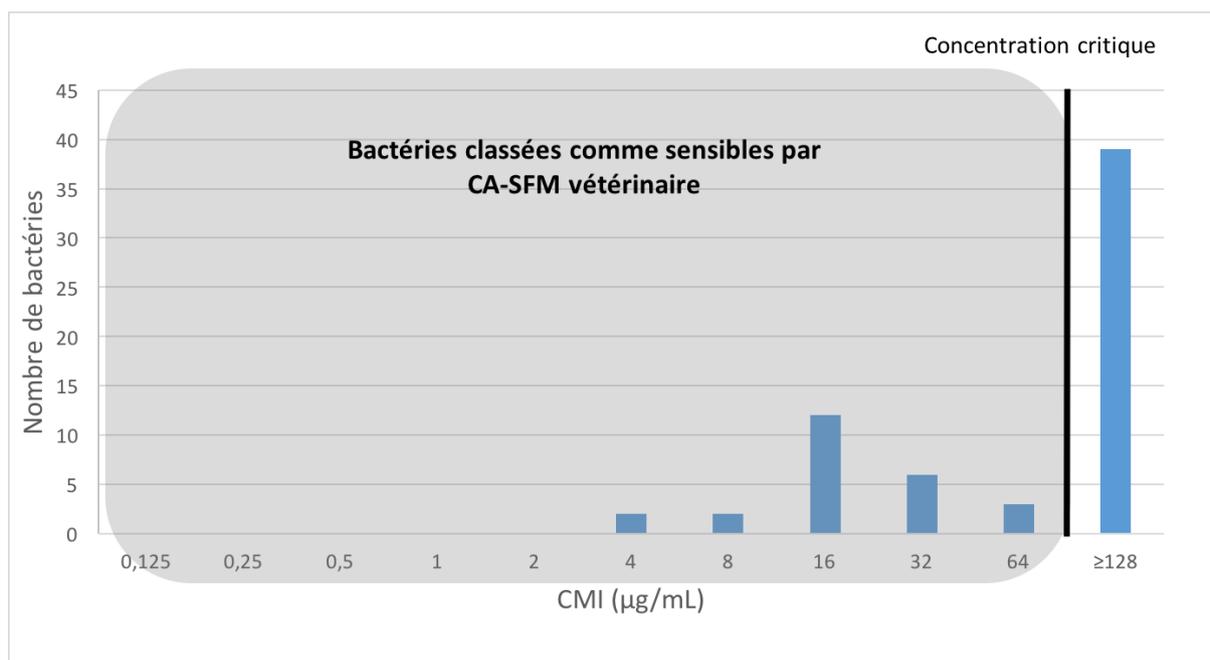


Figure 13: Concentrations minimales inhibitrices en sulfadiazine et seuil clinique (CA-SFM 2017)

1. Sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* aux sulfamides

Les bactéries sensibles selon le CA-SFM représentaient 37,5% des bactéries pour la sulfadiméthoxine et 25% pour la sulfadiazine.

Une majorité des bactéries avaient une CMI en sulfadiméthoxine supérieure à 512 µg/mL. Il en était de même pour la sulfadiazine avec des CMI supérieures à 128µg/mL.

2. Effet de période sur la sensibilité aux sulfamides

Période (nombre de souches testées)	Pourcentage de résistance (%) Sulfadiméthoxine	Pourcentage de résistance (%) Sulfadiazine
Automne 2015 (6)	50,0	16,7
Hiver 2016 (8)	87,5	87,5
Printemps 2016 (24)	79,2	79,2
Avant avril 2017 (15)	26,7	26,7
Avril-juillet 2017 (11)	70,0	80,0

Un effet période très similaire a été remarqué pour la sulfadiméthoxine et la sulfadiazine avec une proportion élevée de résistance en hiver 2016 et au printemps 2016. Les pourcentages sont souvent les mêmes pour les deux molécules ce qui suggère fortement le développement de mécanismes de résistance croisés.

Il est aussi à noter qu'avant avril 2017 le pourcentage de bactéries résistantes était assez faible avec 26,7% puis a augmenté largement durant la période suivante. Il aurait été intéressant de corréliser cette sélection à une utilisation d'antibiotiques dans l'élevage mais les données n'ont pas pu être récupérées pour cette thèse.

3. CMI et concentrations plasmatiques en sulfadiméthoxine

Seules les concentrations plasmatiques en sulfadiméthoxine ont été mesurées dans l'étude précédente et 56,3% des bactéries avaient leur CMI supérieure à ces concentrations obtenues dans le plasma. Il paraît donc difficile d'atteindre des concentrations suffisantes dans le plasma en utilisant la voie orale pour être efficace sur les nombreuses bactéries résistantes.

Pour la sulfadiazine, il aurait été intéressant de comparer les CMI avec des concentrations plasmatiques pour voir s'il est possible d'atteindre des concentrations plus élevées en sulfadiazine par rapport à la sulfadiméthoxine.

C. Détermination de la sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* au florfenicol

Sur le graphique ci-après (figure 14), la répartition des CMI en florfenicol est rapportée.

Selon la CA-SFM, le seuil clinique était estimé à 2µg/mL pour les bactéries considérées comme sensibles.

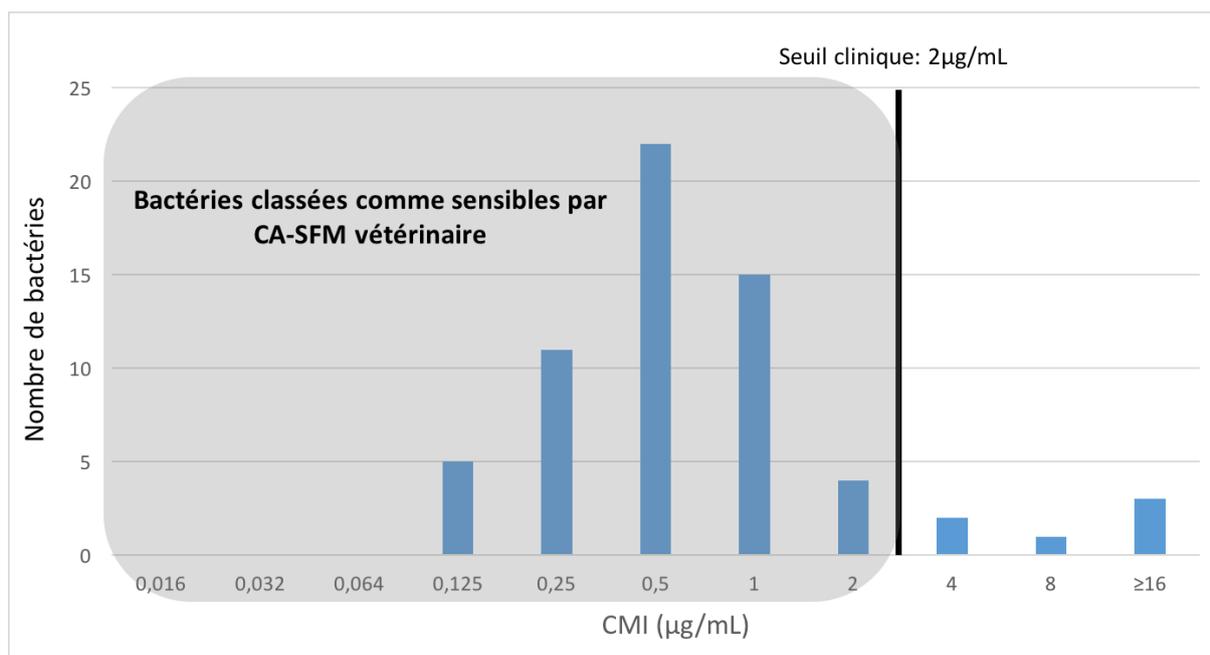


Figure 14: Concentrations minimales inhibitrices en florfénicol sur *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* et seuil clinique (CA-SFM 2017)

1. Sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* au florfénicol

Les CMI en florfénicol étaient centrées autour de 0,5µg/mL avec une population de bactéries classées sensible selon le CA-SFM représentant 90,5% des souches testées. La sensibilité au florfénicol semblait donc très satisfaisante selon les résultats de détermination de la CMI. Néanmoins, il manque des données de pharmacocinétique afin de savoir si ces concentrations inhibitrices peuvent être obtenues dans le sang pour atteindre les bactéries et pour conclure sur l'efficacité d'un traitement au florfénicol.

2. Effet période sur la sensibilité au florfénicol

Période (nombre de souches testées)	Pourcentage de résistance (%)
Automne 2015 (6)	0
Hiver 2016 (8)	12,5
Printemps 2016 (24)	12,5
Avant avril 2017 (14)	6,7
Avril-juillet 2017 (11)	10,0

L'effet période est faible. L'absence de résistance en automne 2015 est à modérer étant donné le faible nombre de bactéries testées à cette période. Le pourcentage de bactéries résistantes semblait stable dans le temps.

D. Détermination de la sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* à la tilmicosine

La figure 15 présente la répartition des CMI en tilmicosine. Le seuil clinique selon la CA-SFM est de 8µg/mL.

Pour la tilmicosine, les concentrations plasmatiques ont été obtenue en traitant 100 agneaux sains en atelier d'engraissement par l'eau de boisson en suivant le protocole suivant : 50mg/kg de tilmicosine (Tilmovet®) le premier jour puis 25mg/kg par jour pendant 4 jours. Ce protocole était donc hors AMM car il n'existe pas d'AMM pour la tilmicosine par voie orale chez l'agneau. Des prises de sang quotidiennes ont permis de déterminer les concentrations plasmatiques en tilmicosine qui sont encadrées en rouge sur le graphique ci-dessous :

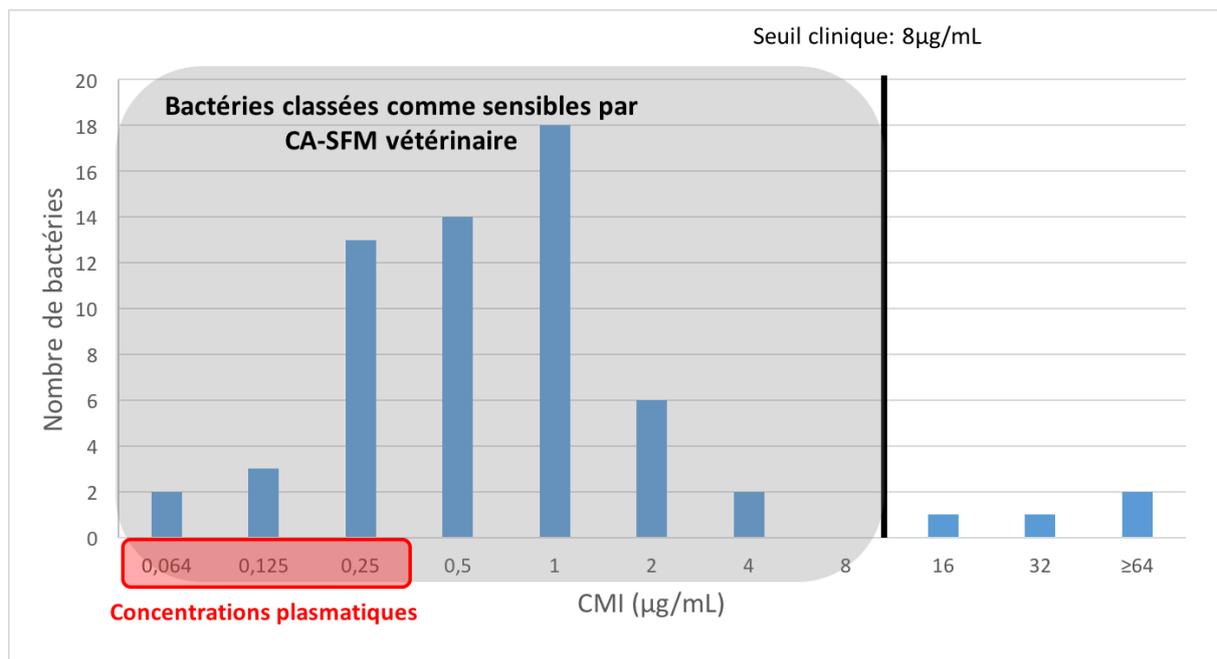


Figure 15: Concentrations minimales inhibitrices en tilmicosine sur *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida*, seuil clinique (CA-SFM, Madec, Decousser 2017) comparés aux concentrations plasmatiques obtenues (Laffay 2017)

1. Sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* à la tilmicosine

Dans le cas de la tilmicosine, la sensibilité était excellente avec 93,5% de bactérie ayant leur CMI inférieure ou égale au seuil clinique. Le graphique montre une répartition en cloche autour de 0,5 et 1µg/mL représentant la majorité des bactéries étant classées comme sensible puis un groupe de bactéries peu nombreuses au-delà de 8µg/mL.

2. Effet période sur la sensibilité à la tilmicosine

Période (nombre de souches testées)	Pourcentage de résistance (%)
Automne 2015 (6)	0
Hiver 2016 (7)	25,0
Printemps 2016 (24)	8,3
2017 avant avril (15)	6,7
2017 avril-juillet (11)	0

Un effet période est remarqué en particulier avec un pourcentage de 25% de résistance en hiver 2016 bien plus élevé que ceux des autres périodes de l'étude.

3. CMI et concentrations plasmatiques en tilmicosine

Malgré une bonne sensibilité des bactéries *in vitro*, seulement 29% des bactéries ont leur CMI inférieure ou égale aux concentrations plasmatiques. Les concentrations plasmatiques obtenues en utilisant la voie orale étaient donc trop faible pour une action efficace sur la majorité des bactéries. La tilmicosine se dissout très bien dans l'eau et les concentrations retrouvées dans les abreuvoirs correspondaient aux concentrations attendues. Une hypothèse est donc que la biodisponibilité de la tilmicosine par voie orale chez l'agneau est faible.

E. Détermination de la sensibilité de *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* à la fluméquine

La répartition des CMI en fluméquine est donnée avec le seuil clinique de 4µg/mL fourni par la CA-SFM sur la figure 16.

L'étude pharmacocinétique a été réalisée pour cette molécule en traitant 25 agneaux en atelier d'engraissement avec une dose de charge le premier jour à 24 mg/kg de fluméquine sous forme de Flumiquil 10%® puis à 12 mg/kg par jour du 2^{ème} au 5^{ème} jour. Des prises de sang ont été réalisées à J1, J3 et J5 et ont montré des concentrations plasmatiques en fluméquine comprises entre 0,2 et 2 µg/mL avec une forte variabilité interindividuelle. Celles-ci sont rapportées dans l'encadré rouge dans le graphique ci-après :

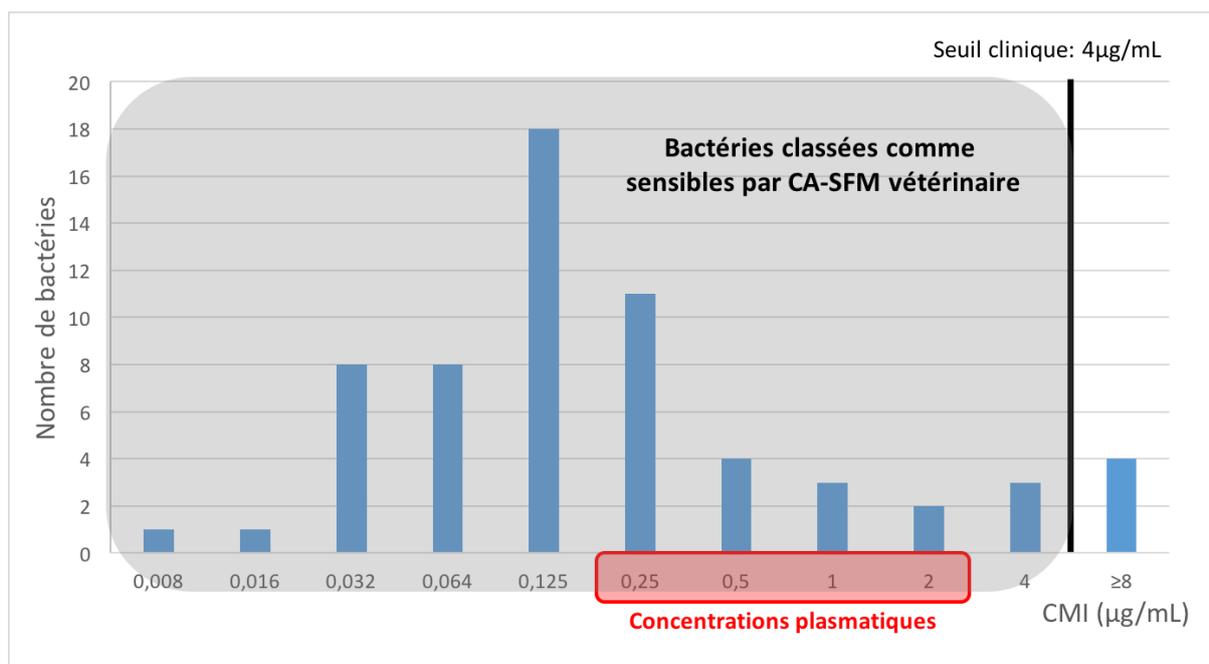


Figure 16: Concentrations minimales inhibitrices en fluméquine sur *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* et seuil clinique (CA-SFM 2017) comparés aux concentrations plasmatiques obtenues (Laffay 2017)

1. Sensibilité de *Mannheimia hæmolytica* et *Pasteurella multocida* à la fluméquine

Les CMI en fluméquine étaient principalement centrées autour de la valeur de 0,125 µg/mL décrivant une courbe en cloche. La sensibilité des bactéries à la fluméquine étaient de 93,7% selon la CA-SFM.

2. Effet période sur la sensibilité à la fluméquine

Période (nombre de souches testées)	Pourcentage de résistance (%)
Automne 2015 (6)	0
Hiver 2016 (7)	25,0
Printemps 2016 (24)	4,2
2017 avant avril (15)	6,7
2017 avril-juillet (11)	10,0

Un effet période était à noter bien que modéré.

3. CMI et concentrations plasmatiques en fluméquine

88,9% des bactéries avaient des CMI inférieures ou égales aux concentrations plasmatiques. D'après cette étude, les concentrations dans le plasma obtenues en utilisant la voie orale seraient donc suffisantes pour une action contre les bactéries ciblées ici. Cela ferait de la fluméquine, d'après ces résultats, l'antibiotique le plus efficace dans

le traitement contre *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* dans les ateliers de cette étude.

F. Effet élevage sur les pourcentages de bactéries résistantes

Sur une période donnée, il était intéressant de déterminer si l'élevage influençait le pourcentage de résistances. La période avant avril 2017 est souvent marquée par un pourcentage de résistances plus faible et cela se retrouve pour chaque antibiotique. Les pourcentages de résistance par élevage sur cette période donnée ont été calculés. Sur cette période, deux élevages ont fourni des souches bactériennes ce qui est assez peu pour être représentatif du bassin d'élevage.

	Elevage 1 (12 souches)	Elevage 2 (3 souches)	Résistance sur la période (15 souches)
Oxytétracycline	0	33,3%	6,7%
Sulfadiméthoxine	16,7%	66,7%	26,7%
Sulfadiazine	16,7%	66,7%	26,7%
Florfénicol	0	33,3%	6,7%
Tilmicosine	0	33,3%	6,7%
Fluméquine	0	33,3%	6,7%

Figure 17: Effet élevage sur le pourcentage de résistance pour la période avant avril 2017

Un effet élevage était retrouvé pour chaque antibiotique. Par exemple, pour l'oxytétracycline, aucune résistance n'était trouvée pour l'élevage 1 pour cette période alors que pour l'élevage 2, elle représentait 33% des souches. La proportion de résistance calculée sur cette période est donc très différente d'un élevage à l'autre.

De plus, il est très probable que, si la même souche résistante diffuse dans l'élevage sur une période ou sur plusieurs périodes, une même souche peut être prélevée plusieurs fois et mener à des pourcentages de résistance élevés comme le montrait le cas de la sulfadiméthoxine dans l'élevage 2 avec 66,7% contre 16,7% dans l'élevage 1 voisin.

Ces résultats soulèvent donc la question de la pertinence de prélever plusieurs fois des animaux dans le même élevage sur la même période.

G. Bactéries multirésistantes

L'effet période pour les sulfonamides montrait clairement des résistances croisées entre la sulfadiméthoxine et la sulfadiazine. Des résistances à plusieurs antibiotiques dans cette étude ont été évaluées dans ce graphique qui montre les pourcentages de bactéries résistantes à 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 des antibiotiques testés.

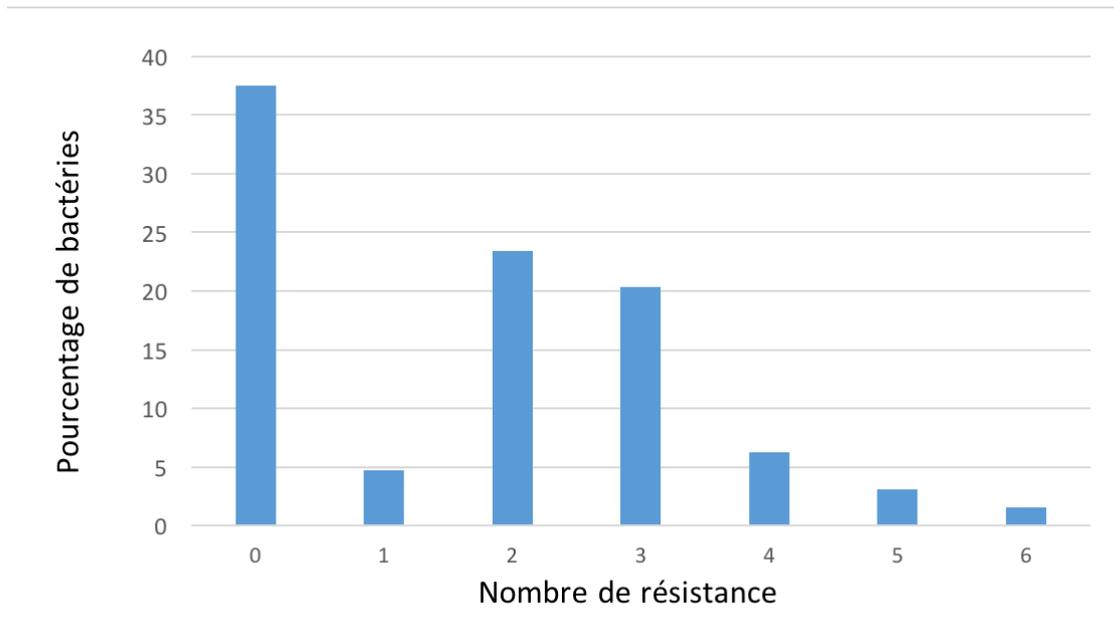


Figure 18: Pourcentage de bactéries multirésistantes sur les 64 souches testées en fonction du nombre d'antibiotiques ciblés par la résistance

Les bactéries ne présentant aucune résistance à ces antibiotiques représentaient 37,5% ce qui est le cas le plus fréquent dans cette étude. Venaient ensuite les bactéries résistantes à deux molécules qui représentent 23,4%. Il est à noter que ces bactéries doublement résistantes étaient toutes résistantes à la sulfadiméthoxine et à la sulfadiazine. Ceci paraît logique étant donnée la proximité entre les deux molécules, un même mécanisme de résistance peut affecter l'efficacité des deux antibiotiques. Ces bactéries dans une étude épidémiologique seraient probablement classées comme résistantes à un seul antibiotique. 20,3% des bactéries étaient résistantes à trois antibiotiques et 100% d'entre elles étaient résistantes à la sulfadiméthoxine, la sulfadiazine et à l'oxytétracycline. Sur les 3 souches résistantes à un seul antibiotique, deux l'étaient à la sulfadiméthoxine.

H. Comparaison des résistances mises en évidence dans cette étude avec celles obtenues par antibiogrammes

Sur les 64 souches bactériennes isolées par le laboratoire d'analyses Aveyron Labo et le laboratoire départemental d'analyses du Tarn, 16 antibiogrammes ont pu être récupérés suite à l'identification des bactéries de l'hiver 2016 au printemps 2017. La sensibilité à plusieurs antibiotiques a été évaluée dont :

- L'association triméthoprime-sulfamides qui peut être partiellement comparée à la sensibilité aux sulfamides
- La tétracycline dont les résultats peuvent être comparés à la sensibilité trouvée pour l'oxytétracycline
- Le florfenicol, la tilmicosine et la fluméquine étudiés précédemment

Les bactéries ont été classées en sensibles, intermédiaires ou résistantes selon la molécule testée. Le tableau ci-dessous montre les résultats des antibiogrammes et, s'ils ne correspondaient pas, les résultats fournis par la CMI entre parenthèses :

Bactérie	TMP-S	Tétracycline	Florfénicol	Tilmicosine	Fluméquine
<i>Pasteurella multocida</i>	S (résistante aux sulfamides)	S	S	S	S
<i>Pasteurella multocida</i>	S	S	S	S	S
<i>Pasteurella multocida</i>	S	S	S	S	S
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S	S	S	S	S
<i>Pasteurella multocida</i>	S	S	S	S	S
<i>Pasteurella multocida</i>	S	S	S	S	S
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S (R aux sulfamides)	S (R à l'oxytétracycline)	S	S	S (R à la fluméquine)
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S	S	S	S	S
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S	R	S	S	S
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S (R aux sulfamides)	S	S	S	S
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S (R aux sulfamides)	S	S	S	S
<i>Pasteurella multocida</i>	S	S	S	S	S
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S	S	S	S	S
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S	S	S	S	S

	(R aux sulfamides)				
<i>Mannheimia haemolytica</i>	S	S	S	I (S à la tilmicosine)	S
<i>Pasteurella multocida</i>	S (R aux sulfamides)	S	S	S	S

Figure 19: Comparaison des résultats des antibiogrammes aux résultats issus de la détermination de la CMI (S=sensible, R=résistante et I=intermédiaire)

Sur ces antibiogrammes, 56,3% étaient en accord avec les résultats donnés par les CMI de chaque antibiotique. Dans ce cas là, les bactéries étaient sensibles à tous les antibiotiques sur l'antibiogramme.

Pour les sulfamides, les antibiogrammes confirmaient pour 62,5% la sensibilité des bactéries aux triméthoprime-sulfamides. Le reste des antibiogrammes montraient des bactéries sensibles aux triméthoprime-sulfamides alors que les CMI montraient clairement une résistance aux sulfamides. Les résultats de l'antibiogramme peuvent être trompeurs pour le vétérinaire car une sensibilité *in vitro* aux triméthoprime-sulfamides ne permet pas de prédire une efficacité chez l'animal. En effet, il a été montré dans le projet OVIBOOST que le triméthoprime ne se dissolvait pas dans l'eau et n'atteignait pas l'abreuvoir et que le triméthoprime n'était pas absorbé par voie orale chez l'agneau sevré. Il en résulte que l'antibiogramme ne devrait pas fournir le résultat pour l'association triméthoprime-sulfamides lorsqu'un usage par voie orale est prévu mais seulement fournir le résultat pour les sulfamides. Les résistances aux sulfamides ayant été détectées pour un large pourcentage de bactéries dans cette étude, il est possible que les antibiogrammes aient conduit à des mauvais choix de traitement.

La sensibilité à l'oxytétracycline se vérifiait dans 93,8% des antibiogrammes avec les résultats concernant la tétracycline.

Les résultats concernant la sensibilité aux florfenicol et la tilmicosine étaient en accord avec tous les antibiogrammes.

Concernant la fluméquine, un antibiogramme mettait en évidence une bactérie sensible alors que la CMI la classait en bactérie résistante.

III. Discussion

A. Limite de la méthode de détermination de la CMI

Par rapport aux résultats des antibiogrammes, la méthode de détermination de la CMI par micro-dilution permet d'obtenir des concentrations qu'il est possible de comparer aux concentrations plasmatiques obtenues chez les animaux traités. Une étude pharmacocinétique préalable est donc indispensable pour estimer l'efficacité d'un antibiotique sur sa cible surtout lorsque l'administration est hors AMM et qu'aucune étude pré-clinique ou clinique n'a été menée sur l'espèce cible. En effet, il a été montré que pour les sulfamides ou la tilmicosine, les bactéries étaient majoritairement classées sensibles par le CA-SFM alors que les concentrations chez l'agneau ne dépassaient quasiment jamais la CMI de ces bactéries.

Même en ayant ces informations, il faut prendre en compte que cette technique de détermination de la CMI *in vitro* s'affranchit non seulement de tous les aspects de la pharmacocinétique mais aussi du système immunitaire, des mécanismes de tolérance ou persistance n'impliquant pas uniquement la cellule bactérienne comme la formation de biofilm, l'influence d'infections concomitantes etc. Beaucoup de paramètres échappent à cette méthode. Par exemple, une étude récente portant sur la tulathromycine, un antibiotique de la même famille que la tilmicosine, et *Pasteurella multocida* montre qu'il peut exister un facteur 30 entre des CMI obtenues dans un milieu de culture MHB et des CMI obtenues dans du sérum porcin (Qiaoyi et al. 2017). Cette étude met en évidence l'importance de la composition des milieux de culture choisis pour la détermination des CMI.

Par ailleurs, on peut se demander si la bonne sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique peut être directement prédictive d'une bonne réponse clinique sur le terrain. Il paraît logique qu'une souche isolée sur un animal montrant une faible CMI en un antibiotique serait liée à un succès thérapeutique par l'usage de cet antibiotique en pratique. Une étude menée aux Etats-Unis sur des veaux en atelier d'engraissement montrant des signes de maladie respiratoire bovine a pourtant mis en évidence les limites de la valeur prédictive de l'analyse des CMI en tilmicosine en matière de réponse clinique sur les bovins. Cette étude a porté sur 976 ateliers d'engraissement entre 1996 et 2004. Les veaux malades subissaient des prélèvements nasaux envoyés pour culture bactérienne et détermination de la CMI en tilmicosine pour chaque souche de *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*. Ils étaient par la suite traités à la tilmicosine à la dose de 10 mg/kg par voie sous cutanée. Aucune relation entre les CMI en tilmicosine et la réponse thérapeutique n'a été mise en évidence (McClary et al. 2011).

B. Intérêt d'une étude pharmacocinétique sur des agneaux cliniques

Lors de l'étude pharmacocinétique, les concentrations plasmatiques ont été obtenues sur des animaux sains. Il serait intéressant de comparer ces données avec des concentrations plasmatiques obtenues chez des agneaux présentant des symptômes respiratoires afin de se mettre dans les mêmes conditions d'absorption du principe actif par le système digestif, de distribution vers les poumons et d'élimination.

C. Effet période ou prélèvement répété d'une même souche ?

L'effet période est marqué pour les sulfamides, l'oxytétracycline, la tilmicosine et la fluméquine et est plus faible pour le florfenicol. Néanmoins, nous pouvons noter que le pourcentage de résistances était plus faible pour les périodes automne 2015 et avant avril

2017. Pour l'hiver 2015, ce faible pourcentage peut être biaisé par le nombre peu important (seulement 6 souches) de bactéries représentant cette population. Pour la période avant avril 2017, l'effet élevage a été montré. La faible proportion de résistances est probablement imputable à quelques souches résistantes prélevées dans le même élevage et donc testées plusieurs fois.

D. Fluméquine : molécule de choix selon cette étude

Suite à cette étude, la fluméquine a été sélectionnée en tant qu'antibiotique de première intention dans le plan thérapeutique des bandes d'octobre 2017. En effet, sa bonne solubilité, la faible résistance des bactéries constatée et des concentrations plasmatiques a priori suffisantes pour un traitement efficace des pathologies respiratoires à pasteurelles en fait un choix évident. Par ailleurs, la fluméquine appartenant aux quinolones de première génération ne figure pas sur la liste des substances antibiotiques d'importance critique non autorisées pour un usage en médecine vétérinaire (McClary et al. 2011). Son utilisation est donc autorisée en vue des réglementations en vigueur depuis le 1^{er} avril 2016 interdisant ou restreignant l'usage de plus de 50 substances dont les quinolones de deuxième génération.

La stratégie de traitement pour la bande d'octobre 2017 a donc été la suivante :

- En cas d'affection respiratoire : utilisation de la fluméquine en première intention sous forme de poudre 10% (Flumiquil®) pendant 5 jours avec une dose de charge à 24 mg/kg le premier jour puis 12 mg/kg/j en dose d'entretien du 2^{ème} au 5^{ème} jour
- En cas d'échec thérapeutique, il est prévu d'envoyer un échantillon prélevé lors d'autopsie pour la recherche de mycoplasmes et la réalisation d'un antibiogramme permettant de mettre en évidence une éventuelle résistance à la fluméquine
- Utilisation d'oxytétracycline (Primox®) en seconde intention à la dose de 50 mg/kg/j pendant 8 jours soit 2,5 fois la dose recommandée par le résumé des caractéristiques du produit. Cette dose est habituellement utilisée par les vétérinaires des groupements Arterris et Unicor.

Un temps d'attente forfaitaire de 28 jours est à respecter pour ces deux antibiotiques en l'absence d'AMM.

E. D'autres alternatives à l'usage d'antibiotique dans la lutte contre la pasteurellose

Etant donné la difficulté à traiter les agneaux déjà atteints, le contrôle de la pasteurellose en atelier d'engraissement doit passer par d'autres moyens afin de prévenir les pertes. Cette prévention se traduit par la réduction des facteurs de risque en améliorant les pratiques d'élevage :

- Assurer une ventilation et une hygrométrie adéquate dans les bâtiments pour éviter l'accumulation de gaz toxiques et irritant les voies respiratoires tels que l'ammoniac
- Réduire les manipulations des animaux et donc le stress
- Réduire la durée et améliorer les conditions de transport des agneaux
- Réduire la densité des agneaux
- Faire des lots d'animaux par classe d'âge pour éviter de mettre les jeunes en contact avec des adultes porteurs de la maladie et si possible en respectant leur provenance pour éviter les mélanges (Scott 2011)

Ces facteurs de risque sont souvent difficiles à éviter et engendrent des coûts supplémentaires. La vaccination des animaux peut alors être une solution. En France,

deux vaccins inactivés avec AMM ovins sont commercialisés : le SALMOPAST® de Merial et OVILIS PASTOVAX® de MSD.

Le vaccin SALMOPAST® est utilisable dans la prévention contre les pasteurelles car il contient les antigènes de *Pasteurella multocida* (sérotypes A3 et D4) et de *Mannheimia haemolytica* (sérotipe A1), mais aussi contre la salmonellose grâce aux antigènes de *Salmonella dublin* et *Salmonella typhimurium*. La préparation est à base de corps bactériens entiers. Le vaccin OVILIS PASTOVAX® ne cible que la pasteurellose avec des corps bactériens inactivés des souches de *Mannheimia haemolytica* (sérotypes A1, A2, A6, A7 et A9) et des souches de *Pasteurella trehalosi*, (sérotypes T3, T4, T10 et T15). La grande différence réside dans le fait que ce vaccin est issu de la nouvelle technologie IRP ou Iron Regulated Protein. En effet, *in vivo*, le fer est en grande partie lié aux protéines et donc inutilisable pour les pasteurelles qui produisent alors des protéines à hautes affinités ou IRP pour le fer sur leur membrane externe. Or, le vaccin OVILIS PASTOVAX® contient ces protéines IRP qui sont hautement immunogènes et permettent d'augmenter l'efficacité vaccinale. L'autre avantage est une protection croisée présumée sur d'autres sérotypes non contenus dans le vaccin bien que celle-ci ne soit pas démontrée. Ce vaccin est indiqué pour une immunisation active contre les bronchopneumonies enzootiques dues à *Mannheimia haemolytica*, (sérotypes A1 et A2) ou contre la pasteurellose septicémique due à *Pasteurella trehalosi* (T10 et T15) mais aussi pour une immunisation passive des agneaux via la vaccination des mères et la prise de colostrum maternel contre les bronchopneumonies enzootiques dues à *Mannheimia haemolytica* (A1 et A2) (Le Moine 2009; Casamitjana 2000). Les protocoles des deux vaccins sont détaillés dans la figure 20.

Protocoles	SALMOPAST®	OVILIS PASTOVAX®
Primo-vaccination des agneaux	Deux injections à 2-4 semaines d'intervalle Dés 8 semaines pour les agneaux issus de brebis non vaccinées, 15 semaines sinon	Deux injections à 4-6 semaines d'intervalle Dés 3 semaines pour les agneaux issus de brebis non vacciné, 5 à 6 semaines sinon Ou 3-4 semaines avant la période à risque (passage en atelier d'engraissement)
Chez la brebis en gestation	2-4 semaines avant la date présumée de mise bas	Annuellement 4-6 semaines avant la mise bas
Rappel	Annuel et 2-4 semaines avant la date présumée de mise bas	Annuel

Figure 20: Protocoles des vaccins OVILIS PASTOVAX et SALMOPAST (Casamitjana 2000; Petit 2013; Le Moine 2009)

Cependant, l'efficacité de ces vaccins est controversée. Ils n'empêcheraient pas l'apparition de signes cliniques mais contribueraient à la réduction de la morbidité, de la mortalité, des lésions et de l'excrétion (Le Moine 2009). Une étude menée en Nouvelle-

Zélande a montré qu'il n'y avait aucune différence significative entre la fréquence d'isolement de *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella trehalosi* ou entre les lésions histopathologiques pulmonaires entre les agneau vaccinés avec OVILIS PASTOVAX® et ceux ayant reçus un placebo (Goodwin-Ray, Stevenson, Heuer 2008).

Dans notre cas, la vaccination n'a pas encore été mise en place dans les groupements ARTERRIS et UNICOR dans les ateliers d'engraissement. Elle commence à se mettre en place sur les brebis dans les élevages naisseurs. Une étude montre pourtant que la vaccination via un protocole complet des agneaux en atelier d'engraissement dans le bassin de Roquefort pourrait diminuer de 1% la mortalité, de moitié les lésions pulmonaires sévères et augmenter le rendement de carcasse par rapport à des agneaux non vaccinés (Dumas 2004).

Conclusion

La limitation de l'usage des antibiotiques est un véritable enjeu pour toutes les professions de santé et notamment pour les vétérinaires. La prévention du développement des résistances est devenu d'une importance capitale pour assurer une efficacité durable des antibiotiques dans le traitement des animaux et des humains. Cela implique une prise de conscience globale à laquelle les éleveurs et les vétérinaires doivent participer conjointement en favorisant une utilisation raisonnée des antimicrobiens. Du côté des éleveurs, des mesures préventives autres que l'antibioprophylaxie peuvent être prises en optant pour la vaccination et en suivant les conseils du vétérinaire en matière de biosécurité. Du côté des vétérinaires, un usage responsable des antibiotiques passe par la justification scientifique d'une prescription. Un test de sensibilité permet de vérifier la pertinence du choix d'un traitement. Il représente donc un outil indispensable dans le contrôle des résistances que ce soit en exercice rural ou avec les animaux de compagnie et de loisir. Le plus simple et le plus rapide reste l'antibiogramme mais la détermination de la CMI peut servir à la détermination de doses efficaces en antibiotique pour améliorer la stratégie thérapeutique sur le terrain comme cela a été le cas dans cette étude.

En effet, cette étude nous a montré que l'évaluation de la pharmacocinétique par mesure des concentrations plasmatiques et de la pharmacodynamie par détermination des CMI pouvait fournir les informations nécessaires au choix thérapeutique et posologique et pouvait maximiser la probabilité d'une réponse clinique favorable. Dans notre cas, la fluméquine a été privilégiée dans le traitement de la pasteurellose en première intention car elle présentait toutes les qualités requises : une bonne solubilité dans l'eau de boisson, peu de résistance et des concentrations plasmatiques suffisantes pour être au dessus de la CMI dans une majorité des cas. Cependant, alors que la CMI peut être obtenue assez facilement ou au moins estimée à partir de l'antibiogramme, la détermination des concentrations plasmatiques et les méthodes de calcul ne sont pas encore accessibles au vétérinaire praticien. Il faudrait proposer des solutions « clés en main » de type application mobile intégrant les concentrations plasmatiques obtenues dans l'espèce après une dose et une voie d'administration données et des calculs automatiques permettant des extrapolations pour des doses différentes et de rendre un résultat en fonction de la valeur de CMI renseignée par le vétérinaire.

Pour compléter ce travail, une étude pharmacocinétique portant sur le florfenicol serait intéressante pour savoir si les concentrations plasmatiques peuvent être plus élevées que les CMI car la sensibilité des bactéries à cet antibiotique était de plus de 90,5 % selon les critères de la CA-SFM.

AGREMENT SCIENTIFIQUE
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Aude FERRAN, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Chloé MASSOL** intitulée « Etude de la sensibilité de *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* prélevées en atelier d'engraissement d'agneaux par détermination de la CMI » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

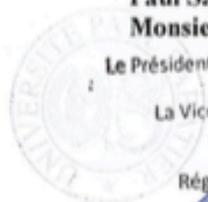

Fait à Toulouse, le 25 octobre 2018
Docteur Aude FERRAN
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christine ROQUES

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL
Le Président de l'Université Paul Sabatier par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU
Régine ANDRE-OBRECHT



Bibliographie

ABADIE, G. et THIERY, R., 2006. Pasteurelloses des petits ruminants: actualité en matière de sérotypage de *Mannheimia haemolytica* et de *Pasteurella trehalosi*. . 2006.

ANSES, 2014. *Évaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale*. 2014. Saisine 2011-SA-0071

ANSES, 2017. *Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales Bilan 2016*. 2017.

ANSES, 2018. Le réseau Résapath. . 2018.

AUTEF, P., 2007. Conduite à tenir devant un syndrome respiratoire chez des agneaux. *Fiches GTV*. Nantes, 2007. pp. 145.

BD, 2013. *BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar - Mode d'emploi*. 2013.

BOUSQUET-MELOU, A., FERRAN, A. et TOUTAIN, P.L., 2012. Impact du schéma posologique sur la résistance. *Bulletin des GTV*. 2012. N° 64, pp. 29-36.

CASAMITJANA, P., 2000. Les pasteurelloses ou pneumonie enzootique. *SNGVT commission ovine, fiche 25*. novembre 2000.

CA-SFM, 2017. *ANTIBIOGRAMME VETERINAIRE DU COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE*. 2017. Société française de microbiologie.

CLSI, 2009. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. Eight edition.

CLSI, 2018. About CLSI. [en ligne]. 2018. [Consulté le 10 avril 2018]. Disponible à l'adresse : <https://clsi.org/about/about-clsi/>

DEL CASTILLO, J.R.E., 2013. Classes of antimicrobial agents - Tétracyclines. In : *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine fifth edition*. pp. 257.

DEMARCO, C.E. et LERNER, S.A., 2009a. Mechanisms of Action of Antimicrobial Agents. In : *Practical Handbook of Microbiology Second edition*. pp. 138.

DEMARCO, C.E. et LERNER, S.A., 2009b. Mechanisms of Action of Antimicrobial Agents. In : *Practical Handbook of Microbiology Second edition*. pp. 140.

DOUART, A., 2002. Les pasteurelloses des petits ruminants. *Le Point Vétérinaire*. 2002. N° 33.

DOWLING, P.M., 2013. Classes of antimicrobial agents - Chloramphenicol, Thiamphenicol and Florfenicol. In : *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine fifth edition*. pp. 269.

DUMAS, A.C., 2004. *Intérêt de l'immunisation active avec le vaccin Ovilis Ovipast sur des agneaux en atelier d'engraissement dans le bassin de Roquefort*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes : Université de Nantes.

EUCAST, 2018a. EUCAST Organization. . 2018.

EUCAST, 2018b. International MIC distribution database. mic.eucast.org [en ligne]. 10 avril 2018. [Consulté le 10 avril 2018]. Disponible à l'adresse : <https://mic.eucast.org/Eucast2/>

- EUCAST, 2018c. Clinical breakpoints. [en ligne]. 2018. [Consulté le 9 avril 2018]. Disponible à l'adresse : http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- EUCAST, 2018d. MIC and zone diameter distributions and ECOFFs. [en ligne]. 2018. [Consulté le 9 avril 2018]. Disponible à l'adresse : http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/
- EUCAST, 2018e. The EUCAST Veterinary Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing (VetCAST). [en ligne]. 2018. [Consulté le 9 avril 2018]. Disponible à l'adresse : <http://www.eucast.org/organization/subcommittees/vetcast/>
- GIGUÈRE, S. et DOWLING, P.M., 2013. Classes of antimicrobial agents - Fluoroquinolones. In : *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine fifth edition*. pp. 298-302.
- GIGUÈRE, S., 2013. Classes of antimicrobial agents - Macrolides, Azalides, and Ketolides. In : *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine fifth edition*. pp. 211-221.
- GOLDMAN, E. et GREEN, L.H., 2009. Mycoplasma and Related Organisms. In : *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition*. pp. 473.
- GOODWIN-RAY, K.A, STEVENSON, M.A et HEUER, C., 2008. Effect of vaccinating lambs against pneumonic pasteurellosis under New Zealand field conditions on their weight gain and pneumonic lung lesions at slaughter. *Veterinary record*. 162. 2008. pp. 9-11.
- HOLMES, K., 2012. Florfenicol pharmacokinetics in healthy adult alpacas after subcutaneous and intramuscular injection. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2012. pp. 35.
- KEHRENBURG, C. et SCHWARZ, S., 2005. Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 773-775. 2005.
- LAFFAY, Floriane, 2017. *Intérêt de l'antibiothérapie collective via l'eau de boisson dans le traitement et la prévention des pneumonies des agneaux en atelier d'engraissement : tests de solubilité et études pharmacocinétiques impliquant l'association sulfadiméthoxine-triméthoprime*. Thèse d'exercice vétérinaire. Toulouse : ENVT.
- LE GUEN, A., 2007. *Etat des lieux et pistes d'optimisation de la filière engraissement des agneaux du groupement de producteurs UNICOR (Aveyron)*. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
- LE MOINE, C., 2009. *Vaccins et vaccination chez le ovins*. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort : Faculté de médecine de Créteil.
- MCCLARY, DAVID, G., LONERAGAN, GUY, H., SHRYOCK, THOMAS, R., CARTER, BRANDON, L., GUTHRIE, CARL, A., CORBIN, MARILYN, J., MECHOR et GERALD, D., 2011. Relationship of in vitro minimum inhibitory concentrations of tilmicosin against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* and in vivo tilmicosin treatment outcome among calves with signs of bovine respiratory disease. . 2011. pp. 7.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT, 2017. *Le plan écoantibio 2012-2016: synthèse et principales réalisations*. 2017.
- MINISTRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT, 2016. *Arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances antibiotiques d'importance critique prévue à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique et fixant la liste des méthodes de réalisation du test de détermination de la sensibilité des souches bactériennes prévue*

à l'article R. 5141-117-2. 18 mars 2016.

NACCARI, F., GIOFFRE, F., PELLEGRINO, M., CALO, M., LICATA, P. et CARLI, S., 2001. Effectiveness and kinetic behaviour of tilmicosin in the treatment of respiratory infections in sheep. *Veterinary Record*. n°148. 2001. pp. 773-776.

NATORP, J.C, 2013. Intérêt, limites et conditions des suivis d'élevage en médecine vétérinaire ovine. . Bulletin de l'académie vétérinaire de France. 2013.

ODUGBO, M.O., ODAMA, L.E, UMOH, J.U et LAMORDE, A.G, 2006. Pasteurella multocida pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies. *Small Ruminant Research*. Nigeria, 2006. pp. 66.

OZYLDIZ, Zafer, TEL, Osman Yasar, OZSOY, Sule Yurdagul et KESKIN, Oktay, 2013. Pathological and Microbiological Investigations of Pneumonic Pasteurellosis in Sheep. *Kafkas University Veterinary Fak Derg*. Numéro 19. 2013. pp. 103-108.

PETIT, S., 2013. *Guide thérapeutique vétérinaire 2013 animaux de rente*. 4ème édition. Les éditions du point vétérinaire.

PRACHE, S., BENOIT, M., BOUTONNET, J.-P., FRANÇOIS, D. et SAGOT, L., 2013. La production d'ovins-viande en France 1ère partie. *Viandes et produits carnés*. 2013.

PRESCOTT, J.F., 2013. Classes of antimicrobial agents - Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations. In : *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine fifth edition*. pp. 279.

PUGH, D.G et BAIRD, A.N., 2012. Diseases of the Respiratory System. In : *Sheep and goat medicine*. pp. 136-138.

PUGH, D.G, 2011. *Sheep and goat medicine Second edition*. Elsevier.

QIAOYI, Z., GUIJUN, Z., QIN, W. et WENGUANG, L., 2017. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Tulathromycin against Pasteurella multocida in a Porcine Tissue Cage Model. *Frontiers in pharmacology*. 8. juin 2017. pp. 392.

RUBIN, J.E, 2013a. Antimicrobial susceptibility testing methods and interpretation of results. In : *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine fifth edition*. pp. 11-12.

RUBIN, J.E, 2013b. Antimicrobial susceptibility testing methods and interpretation of results. In : *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine fifth edition*. pp. 13.

SCHWARZ, S., KEHRENBERG, C., DOUBLET, B. et CLOECKAERT, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* 28. 2004.

SCOTT, Philip R., 2011. Treatment and control of respiratory disease in sheep. *Veterinary clinics: food animal practice*. Division of Veterinary Clinical Sciences, R(D)SVS, University of Edinburgh, Easter Bush, Roslin, Midlothian, Scotland, EH25 9RG, UK, 2011. pp. 175-186.

SFM, 2018. Présentation de la société. [en ligne]. 2018. [Consulté le 10 avril 2018]. Disponible à l'adresse : http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/46.html

SHEEHAN, M., CASSIDY, J.P., BRADY, J., BALL, H., DOHERTY, M.L., QUINN, P.J., NICHOLAS, R.A.J. et MARKEY, B.K., 2007. An aetiopathological study of chronic bronchopneumonia in lambs in Ireland. *The Veterinary Journal* 173, 630-637. 2007.

SIGMA-ALDRICH, 2018. Mueller Hinton Broth. . 2018.

SKOLD, O., 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*. 32. 2001. pp. 261-273.

TUTTLE, AD., 2006. Bone marrow hypoplasia secondary to florfenicol toxicity in a Thomson's gazelle (*Gazella thomsonii*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 317. 2006. pp. 29.

WANGER, A., 2009a. Antibiotic susceptibility testing. In : *Practical handbook of microbiology Second edition*. pp. 150-151.

WANGER, A., 2009b. Antibiotic susceptibility testing. In : *Practical handbook of microbiology Second edition*. pp. 152-153.

Toulouse, 2018

NOM : MASSOL PRENOM : Chloé

TITRE : Etude de la sensibilité de *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* prélevées en atelier d'engraissement d'agneaux par détermination de la CMI

RÉSUMÉ : La pasteurellose est une pathologie respiratoire fréquente en atelier d'engraissement d'agneaux dans le Bassin de Roquefort (Aveyron). Afin de réduire et d'optimiser l'usage des antibiotiques dans les infections à *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*, une meilleure connaissance des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des antibiotiques dans cette espèce est nécessaire. Cette étude a consisté à déterminer les CMI en oxytétracycline, sulfadiméthoxine, sulfadiazine, florfenicol, tilmicosine et fluméquine pour 64 bactéries isolées sur le terrain et à les comparer aux concentrations plasmatiques en antibiotiques observées chez des agneaux traités par l'eau de boisson. Les résultats ont mis en évidence des proportions élevées de résistance à la sulfadiméthoxine (62,5%) et la sulfadiazine (75%). Une bonne sensibilité a été trouvée pour l'oxytétracycline (67,2%), le florfenicol (90,5%), la tilmicosine (93,5%) et la fluméquine (93,7%) mais seules les concentrations plasmatiques en fluméquine et en oxytétracycline (florfenicol et sulfadiazine non étudiés) étaient supérieures aux CMI. La fluméquine a donc été recommandée comme stratégie thérapeutique de première intention dans ces élevages.

MOTS-CLES : CMI - antibiotiques - antibiorésistance - pasteurelles - agneau

ENGLISH TITLE: Antibiotic susceptibility of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates from feeder lambs using broth microdilution method

ABSTRACT: The pasteurellosis is one of the main pathological issue in fattening farms for lamb in the Bassin de Roquefort (Aveyron). In this species, a better analysis of the antibiotics' pharmacokinetic and pharmacodynamic properties is needed in order to reduce and optimize their use in the treatment of infections caused by *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. The aim of this study was to obtain the MICs of oxytetracycline, sulfadimethoxine, sulfadiazine, florfenicol, tilmicosin and flumequine concerning 64 bacterial isolates taken from sick lambs and to compare them to the concentrations observed in the plasma of lambs that were treated using the oral route. The results showed a high level of resistance to sulfadimethoxine (62,5%) and sulfadiazine (75%). A good susceptibility to oxytetracycline (67,2%), florfenicol (90,5%), tilmicosin (93,5%) and flumequine (93,7%) was noted but only the plasma concentrations in flumequine and in oxytetracycline (no data for florfenicol and sulfadiazine) were above the MICs. In these fattening houses, the use of flumequine was recommended as a first option in the new therapeutic strategy.

KEYWORDS: MIC – antibiotics – resistance – pasteurella – lamb