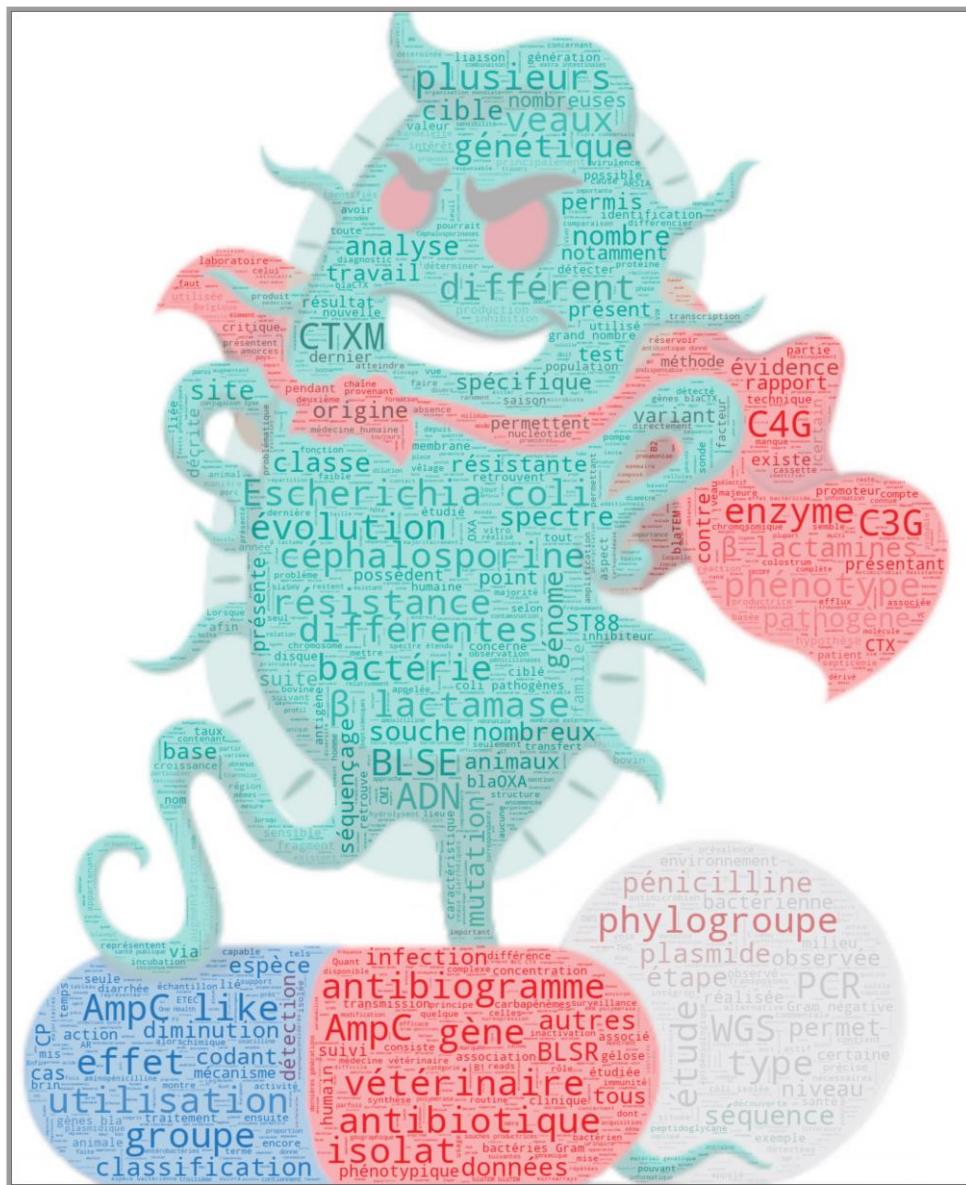


Résistances aux β -lactamines chez *Escherichia coli* d'origine bovine : évolution phénotypique et bases génétiques

β-lactam resistance of bovine *Escherichia coli*: phenotypic evolution and genetic bases



Virginie Guérin



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

DÉPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES

SERVICE DE BACTÉRIOLOGIE

**Résistances aux β -lactamines chez *Escherichia coli* d'origine bovine :
évolution phénotypique et bases génétiques**

**β -lactam resistance of bovine *Escherichia coli*:
phenotypic evolution and genetic bases**

Virginie Guérin

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

Docteur en Sciences Vétérinaires

ANNÉE ACADEMIQUE 2020-2021

*À ma mamy...
À ma famille...*

Remerciements

Une thèse est une aventure, scientifique et personnelle, qui pour ma part, a été faite de belles découvertes mais représentait aussi un défi tant personnel que professionnel. Que la personne qui en doute ne s'y leurre pas, ce n'est pas un voyage qui s'accomplit seul. Heureusement, de nombreuses personnes m'ont accompagnée tout au long de ce parcours, et, sans elles, je n'en serais probablement pas là aujourd'hui.

Tout d'abord, il m'est indispensable de remercier mon promoteur, Jacques Mainil, qui a réussi à me guider et à me canaliser tout au long de ces quatre années. Cette immersion dans le monde de la bactériologie s'est accompagnée de nombreuses questions, face auxquelles il a fait preuve d'une patience presque infinie, et pour cela également, je l'en remercie.

Le projet de recherche sur lequel est basé cette thèse, consiste en une collaboration entre le laboratoire de bactériologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (FMV), l'Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA) et le Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP) sous le financement du SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne Alimentaire et Environnement sous (convention RF 17/6317 RU-BLA-ESBL-CPE). Je n'aurai pu imaginer meilleur moyen de réaliser une thèse car cette collaboration m'a permis de rencontrer des personnes formidables.

Dans l'avancée de ces travaux, Damien Thiry a été l'un des moteurs indispensables, via nos nombreuses discussions qui ont toujours eu lieu dans la bonne humeur. Parmi les personnes de l'équipe de Bactériologie, je ne peux passer à côté de Jean-Noël Duprez, pour l'ensemble de ses conseils techniques et pratiques qui m'ont permis d'évoluer au sein du laboratoire comme un poisson dans l'eau, ainsi que d'Audrey Depas, une personne magnifique sans qui le temps passé en bactériologie aurait été bien triste. Sans oublier nos voisins les « sauvages », ils se reconnaîtront, dont les analyses des matches de foot et autres conversations totalement hors sujet sont indispensables à la bonne ambiance et à l'esprit d'équipe.

À Marc Saulmont, j'exprime mes sincères remerciements, pour avoir été présent tout au long de ce travail, et pour m'avoir permis d'aborder l'aspect du diagnostic de laboratoire ainsi que pour nos échanges constructifs sur ce projet. Je tiens également à remercier toute son équipe, pour avoir permis la récolte des souches bactériennes, matériel de base pour ce travail, et m'avoir fourni les résultats des tests réalisés à l'ARSIA.

À Moreno Galleni, ainsi qu'à Paola Mercuri et à mon co-doctorant de projet Frédéric Cawez, j'adresse de sincères remerciements pour leur accompagnement et les nombreux échanges qui ont eu lieu dans le cadre de ce projet, puissent-ils se poursuivre à l'avenir.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu être celui qu'il est sans Philippe Glaser, qui a eu l'immense gentillesse de m'accueillir pour six mois dans son unité, Écologie et Évolution de la Résistance aux Antibiotiques, de l'Institut Pasteur de Paris. Malgré une situation sanitaire difficile, ce séjour de recherche a été une merveilleuse expérience. Je tiens à souligner le travail d'encadrement exceptionnel de Nicolas Cabanel, qui m'a appris les étapes de préparation et d'analyse des séquences génomiques en un laps de temps très court. Il m'a également donné de sacrés fous-rires et de belles anecdotes à raconter. J'ai également eu

l'occasion de rencontrer une « petite voix » lors des réunions de laboratoire par écran interposé, Isabelle Rosinski-Chupin, qui a toujours su faire des remarques pertinentes sur mon travail et m'a permis de l'améliorer, et pour cela je tiens à la remercier. Ce séjour parisien n'aurait pu avoir lieu sans le financement de la Fédération Wallonie-Bruxelles et de l'Université de Liège.

Sans oublier les nombreuses personnes que j'ai eu l'occasion de rencontrer au travers de ce travail et qui m'ont permis de le réaliser : Peter Boleij et Joep van Bortel de la firme B.V. Checkpoint (Pays-Bas) pour m'avoir accueillie et enseigné les techniques des tests par *microarrays*, ainsi que pour les discussions sur l'analyse des résultats obtenus ; Yannick Blanchard et Pierrick Lucas de l'ANSES, pour leur patience envers la néophyte du séquençage que j'étais et leurs réponses à mes questions.

Bien entendu, la thèse n'aurait pas eu la même saveur sans toutes les personnes rencontrées au grès des différents laboratoires et congrès, notamment tous mes co-doctorants (Adriana, Audrey, Céline, Cyrille, Dieudonné, Fanny) ainsi que les différents stagiaires (Anis, Floriane, Ninon, Rie, Sébastien) avec qui j'ai eu de nombreux échanges constructifs, mais aussi de bons moments de détente.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis. Mes parents tout d'abord, qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont transmis le goût de la lecture et une grande curiosité, sans lesquels le parcours du doctorat n'aurait probablement pas été le même. Mon petit frère, pour tous ces bons moments, malheureusement de plus en plus rares, passés ensemble. Mes grands-parents paternels, qui m'ont soutenu chacun à leur manière, tout au long de mon parcours. Ma Mamy, qui n'aura pas eu l'occasion de voir l'aboutissement de ce travail, mais qui m'a apportée bien plus qu'elle n'a pu l'imaginer, et dont les pensées continuent de m'accompagner. Alban, pour m'avoir supportée pendant ces quatre années, dans les moments merveilleux tout autant que dans les difficiles ainsi que pendant la rédaction de ce manuscrit. J'espère t'avoir rendu la pareille, comme promis à ta soutenance de thèse. Puissions-nous continuer notre chemin ensemble encore longtemps. Enfin, je ne peux oublier de citer mes compagnons à quatre pattes, qui, à leur manière, m'ont apporté soutien et réconfort, et n'en ont très probablement absolument rien à faire de ces lignes, tant qu'ils ont à manger, et des genoux pour dormir. Les sessions de rédaction n'auraient pas été les mêmes sans eux.

Je tiens à remercier tous mes amis, pour les bons moments passés ensemble. Avec une mention spéciale à mes amis karateka, qui m'ont accompagnée pendant une longue partie de mon chemin, commencé bien avant la thèse et qui continuera, je l'espère, bien après, malgré la distance qui nous sépare. La personne que je suis n'aurais pas été la même sans vous.

À tous ceux que j'ai pu oublier de citer, mes sincères excuses, sachez que vous avez tous participé, de près ou de loin, à ce parcours de longue haleine, et pour cela je vous en remercie.

Pour finir, je remercie chaque personne qui prendra le temps de lire ce travail, puisse-t-il vous faire voyager dans le monde des bactéries et de la résistance aux antibiotiques comme il m'y a emporté.

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre »

Aristote

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	C4G : Céphalosporines de 4 ^{ème} génération = 4GC : <i>4th generation cephalosporins</i>
AEEC : <i>Escherichia coli</i> attachant-effaçant	
AMC : Amoxicilline + acide clavulanique	C5G : Céphalosporines de 5 ^{ème} génération = 5GC : <i>5th generation cephalosporins</i>
AmpC : Céphalosporinases	CC : Complexe clonal
AmpC-like : BLSR avec une résistance à la céfoxitine	CFQ : Cefquinome
AMR : <i>Antimicrobial Resistance</i> , résistance aux antimicrobiens	cgMLST : <i>Core genome multilocus-sequence-typing</i>
AMX : Amoxicilline	CI : Contenu intestinal
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	CLSI : <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
AR-2016 : Arrêté Royal du 21 juillet 2016 = RD-2016 : <i>Royal Decree of July 2016</i>	CMI : Concentration minimale inhibitrice
ARN : Acide ribonucléique	CP : Carbapénémases
ARNm : Acide ribonucléique messager	CTC : Céfotaxime + Acide clavulanique
ARNt : Acide ribonucléique de transfert	CTX : Céfotaxime
ARSIA : Association régionale de santé et d'identification animales	CTX-M : Céfotaximase
<i>bla</i> : Gène codant pour une β-lactamase	DDA : <i>Disk diffusion assay</i> , antibiogramme par diffusion des disques sur gélose
BLA : β-lactamase	DGZ : <i>Dierengezondheidszorg-Vlaanderen</i>
BLSE : β-lactamases-à-spectre-étendu = ESBL : <i>Extended-Spectrum-β-Lactamases</i>	<i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i>
BLSR : β-lactamases-à-spectre-restréint = NSBL : <i>Narrow-Spectrum-β-Lactamases</i>	EARS-Net : <i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i> , système de surveillance des résistances aux antimicrobiens
C1G : Céphalosporines de 1 ^{ère} génération = 1GC : <i>1st generation cephalosporins</i>	ECOFF : <i>Epidemiological Cut-Off</i> , valeurs seuils microbiologiques
C2G : Céphalosporines de 2 ^{ème} génération = 2GC : <i>2nd generation cephalosporins</i>	EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
C3G : Céphalosporines de 3 ^{ème} génération = 3GC : <i>3rd generation cephalosporins</i>	EFSA : <i>European Food Safety Authority</i> , Autorité européenne de sécurité des aliments
	EPEC : <i>Escherichia coli</i> entéropathogène
	ETEC : <i>Escherichia coli</i> enterotoxinogène

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i> , réactions de polymérase en chaîne
FAO : <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> , organisation des Nations Unies pour l'alimentation et pour l'agriculture	PDF : <i>Probability density function</i> , densité de probabilité
FOX : Céfoxitine	R : Résistant, <i>resistant</i>
FV : facteurs de virulence	S : Sensible, <i>susceptible</i>
I : Sensible à haute dose, <i>intermediate</i>	SNP : <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , changement d'une base
LPS : LipoPolySaccharide (molécules de)	ST: <i>sequence type</i> , profil allélique
MA : <i>Microarrays</i> , micro-puces à ADN	STEC : <i>Escherichia coli</i> productrice de Shiga-toxine
MALDI-TOF : <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i>	THG : transfert horizontal de gènes
MBL : Métallo-β-lactamase	VC : valeurs seuils cliniques (de la CMI), <i>clinical breakpoint</i>
McC-CTX : MacConkey-Céfotaxime	VetCAST : <i>Veterinary Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
MER : Méropénème	VIM : <i>Verona Integron-Mediated Metallo-β-lactamase</i>
MF : Matières fécales	VTEC : <i>Escherichia coli</i> verotoxinogène
MLST : <i>multilocus-sequence-typing</i>	wgMLST : <i>whole genome multilocus-sequence-typing</i>
OIE : Organisation mondiale de la santé animale, <i>World Organization for Animal Health</i>	WGS : <i>Whole genome sequencing</i> , séquençage complet du génome
OMS : Organisation mondiale de la santé = WHO : <i>World Health Organization</i>	XNL : Ceftiofur
ORF : <i>Open Reading Frame</i> , cadre ouvert de lecture	
PBP : <i>Penicillin Binding Proteins</i> , protéines liant la pénicilline	

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	7
Table des matières	10
Liste des figures et tableaux	14
Figures :	15
Tableaux :	17
Résumé - Summary	18
Résumé	19
Summary	21
Préambule	23
Introduction	25
1. <i>Escherichia coli</i> , une bactérie aux multiples facettes	26
1.1 Caractéristiques	26
1.1.1 Structure	26
1.1.2 Pouvoir pathogène	28
1.1.3 Génétique.....	28
1.2 Diversité et classification	30
1.2.1 Sérotypes	30
1.2.2 Pathotypes	30
1.2.3 Profils alléliques ou <i>sequence types</i> (ST).....	30
1.2.4 Phylogroupes	33
1.3 <i>Escherichia coli</i> en tant qu'agent pathogène chez les bovins	33
1.3.1 Facteurs prédisposant des veaux	33
1.3.2 Infections par <i>E. coli</i> chez les veaux	34
2. Antibiotiques et résistance bactérienne : principes généraux	35
2.1 Modes d'action des antibiotiques	35
2.1.1 Action sur la paroi ou les membranes bactériennes	35
2.1.2 Action sur l'ADN : réparation, réPLICATION, transcription.....	36
2.1.3 Action sur la synthèse des protéines.....	36

2.2 Mécanismes de résistance utilisés par les bactéries.....	36
2.2.1 Mutation de la cible ou stratégie d'évitement	37
2.2.2 Modification de la perméabilité membranaire (porine).....	37
2.2.3 Expulsion de l'antibiotique (pompes à efflux)	37
2.2.4 Production d'une enzyme agissant sur l'antibiotique.....	37
3. β-lactamines et résistances aux β-lactamines	38
3.1 Les β-lactamines.....	38
3.1.1 Pénicillines	40
3.1.2 Céphalosporines	41
3.1.3 Carbapénèmes	41
3.1.4 Monobactames.....	42
3.2 Les β-lactamases.....	42
3.2.1 β-lactamases-à-spectre-restréint (BLSR) ou <i>Narrow-Spectrum-β-lactamases</i> (NSBL)...	42
3.2.2 β-lactamases-à-spectre-étendu (BLSE) ou <i>Extended-Spectrum-β-lactamases</i> (ESBL) ...	43
3.2.3 Céphalosporinases (AmpC).....	43
3.2.4 Carbapénémases (CP).....	44
3.3. Classifications spécifiques des β-lactamases.....	44
3.3.1 Ambler.....	44
3.3.2 Bush.....	45
4. Méthodes de détection des résistances	47
4.1 Phénotypiques	47
4.1.1 Diffusion de disques sur gélose ou <i>Disk-Diffusion-Assay</i> (DDA)	50
4.1.2 Dilutions en bouillon	51
4.1.3 Bandelettes (Etest®).....	52
4.2 Génétiques	52
4.2.1 Méthodes d'extraction de l'ADN bactérien	52
4.2.2 Réaction en chaîne par polymérase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	52
4.2.3 Séquençage complet du génome ou <i>Whole Genome Sequencing</i> (WGS)	54
4.2.4 Micro-puces à ADN ou <i>microarrays</i> (MA).....	58

5. Suivi et situation des résistances aux β-lactamines	60
5.1 Les résistances, un problème mondial	60
5.2 Qu'en est-il chez nous ? Focus sur l'Europe et la Belgique	62
Objectifs	67
Section expérimentale	69
1. Matériel et Méthodes	70
1.1 Échantillonnage	70
1.1.1 Les matières fécales et contenus intestinaux	71
1.1.2 Les organes internes	71
1.1.3 Cryopréservation	71
1.2 Agglutinations sérologiques	72
1.3 Antibiogrammes	73
2. Résultats globaux : description de la collection	74
2.1 Collection	74
2.2 Phénotypes de résistance	74
Étude 1 :	76
Étude 2 :	93
Étude 3 :	102
Étude 4 :	116
Discussion – Perspectives.....	133
Bibliographie.....	142

Liste des figures et tableaux

Figures :

Figure 1 : Structure générale d'une bactérie (1a) et comparaison de la structure de la paroi entre bactérie Gram positive et Gram négative (1b)	27
Figure 2 : Organisation typique d'un gène bactérien avec les régions importantes du promoteur	28
Figure 3 : Sites d'action et effet des différentes familles d'antibiotiques	35
Figure 4 : Structure des antibiotiques de la famille des β -lactamines et similarité avec la séquence peptidique D-Ala-D-Ala	38
Figure 5 : Structure (5a et b) et formation du peptidoglycane, par la transpeptidation et inhibition de la réaction par les β -lactamines (5c)	39
Figure 6 : Hydrolyse par les β -lactamases du cycle β -lactame	40
Figure 7 : Méthodes phénotypiques de détections des résistances par antibiogramme avec diffusions de disques en milieu gélosé, e-test et dilutions en milieux liquides	49
Figure 8 : Synergie entre les céphalosporines et l'inhibiteur des β -lactamases observée lors de la détection d'une bactérie productrice de β -lactamases-à-spectre-étendu	51
Figure 9 : Étapes de la réaction en chaîne par polymérase (PCR, <i>polymerase chain reaction</i>)	53
Figure 10 : Méthode de fonctionnement d'une analyse par séquençage complet du génome	56
Figure 11 : Principe de fonctionnement des <i>microarrays</i> , d'après Endimiani et collaborateurs (2010)	59
Figure 12 : Schématisation du concept du <i>One Health</i> , avec la triade impliquée	61
Figure 13 : Voies d'échange des bactéries et des gènes de résistance aux antimicrobiens entre les différents réservoirs	61
Figure 14 : Pourcentage d' <i>Escherichia coli</i> invasives résistantes aux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et/ou ceftriaxone et/ou ceftazidime) (14a) et aux carbapénèmes (imipénème et/ou méropénème) (14b) chez l'être humain, par pays de l'Union Européenne/Espace Économique Européen pour 2019	63
Figure 15 : Évolution des résistances d' <i>Escherichia coli</i> de bovins en Wallonie (15a), en Flandre (15b) et en France (15c)	65
Figure 16 : Étapes de la collecte des isolats d' <i>Escherichia coli</i> pathogènes et non-pathogènes provenant de bovins en Wallonie	70
Figure 17 : Test de séro-agglutination d' <i>Escherichia coli</i> pour la <i>fimbriae F5</i>	72
Étude 1_ Figure 1: A posteriori probability density function of the theoretical proportion of resistant isolates p for the 2 nd season NSBL (a) and for the 5 th season AmpC (b)	82
Étude 1_ Figure 2: Evolution of the theoretical proportion of resistant isolates of the seasons for (a) across all categories as well as for (b) NSBL, (c) ESBL, (d) AmpC and (e) AmpC-like categories	86
Étude 3_ Figure 1: Proportions of <i>Escherichia coli</i> isolates in each CTX-M-targeted-groups with the triplex PCR for each calving season (from 2017-2018 to 2019-2020)	114
Étude 4_ Figure 1 : Répartition géographique des 522 <i>Escherichia coli</i> isolées de veaux diarrhéiques ou septicémiques en Wallonie et analysées par séquençage complet du génome selon leur saison de vêlage (de 2017-2018 à 2019-2020) (1a) et densité de la population bovine par surface agricole utile en Wallonie (1b)	121

Étude 4_ Figure 2 : Répartition géographique des ST majoritaires, comportant plus de 10 isolats, déterminés à partir des 522 séquences d' <i>Escherichia coli</i> provenant de veaux diarrhéiques ou septicémiques isolées en Wallonie pendant 3 saisons de vêlage successives (de 2017-2018 à 2019-2020)	124
Étude 4_ Figure 3 : Phylogénie des 522 <i>Escherichia coli</i> isolées de bovins diarrhéiques ou septicémiques en Wallonie pendant 3 saisons successives de vêlage (de 2017-2018 à 2019-2020), représentant les phylogroupes, les familles de résistances aux antibiotiques détectées ainsi que le nombre total de gènes de résistance et les types séquentiels (ST)	125

Tableaux :

Tableau I : Pathotypes d' <i>Escherichia coli</i> et facteurs de virulence associés pouvant être détectés chez les bovins ou chez l'homme, adapté de Mainil et Fairbrother, 2014	31
Tableau II : Classification des β -lactamases selon Bush et Jacoby (2010) et mise en relation avec la classification d'Ambler (1980)	46
Tableau III : Phénotypes de résistance pouvant être observés pour les huit β -lactamines testées par antibiogramme, via la diffusion des disques sur gélose	73
Tableau IV : Caractéristiques de virulence et phénotypes de résistance aux β -lactamines des <i>Escherichia coli</i> isolées de bovins en Wallonie pendant 3 saisons successives de vêlage (de 2017-2018 à 2019-2020)	75
Étude 1_Table I: Resistance profiles for eight β -lactams observed at the disk diffusion assay, adapted from Guérin <i>et al.</i> , 2021	81
Étude 1_Table II: Number and proportion of <i>Escherichia coli</i> isolates tested by disk diffusion assay for each calving season (from 2014-2015 to 2020-2021)	83
Étude 1_Table III: Results of Fisher's exact test (p-value) for each resistance profile over the seven calving seasons	85
Étude 1_Table IV: Results of Fisher's exact test (p-value) for each resistance profile of <i>Escherichia coli</i> depending of their origin, over seven calving season (from 2014-2015 to 2020-2021)	88
Étude 1_Table V: Repartition of the various <i>Escherichia coli</i> virulotypes over the resistance profiles, all seven calving seasons considered together	88
Étude 2_Table 1: Classification of resistance based on the profile observed at the disk diffusion assay in <i>Escherichia coli</i> isolated from young diarrheic or septicemic calves	97
Étude 2_Table 2: Targeted families of <i>bla</i> genes by the Check-MDR CT103XL microarray kit	97
Étude 2_Table 3: Disk diffusion assay phenotypes ans genes involved in β -lactam resistance detected by microarrays in 94 bovine <i>Escherichia coli</i> isolates	98
Étude 2_Table 4: Detected genes involved in β -lactam resistance after whole genome sequencing of 43 isolates with different disk diffusion assay and microarrays matching results	99
Étude 3_Table 1: Repartition of the <i>Escherichia coli</i> with an ESBL phenotype at the disk diffusion assay in CTX-M-groups detected by the triplex PCR isolated from Belgian calves during three calving seasons (from 2017-2018 to 2019-2020)	113
Étude 3_Table 2: For each CTX-M group and each comparison, results of Fisher's exact test (the p-value) and of the Bayesian inversion (the probability)	113
Étude 4_Tableau I : Type séquenciel (ST) et complexes clonaux (CC) associés aux phylogroupes déterminés dans les 522 isolats d' <i>Escherichia coli</i> provenant de veaux diarrhéiques ou septicémiques collectés sur 3 saisons de vêlage successives (de 2017-2018 à 2019-2020)	123
Étude 4_Tableau II : Gènes <i>bla</i> identifiés dans les <i>Escherichia coli</i> isolées de bovins, ST et phylogroupes des isolats concernés	127
Étude 4_Tableau III : Nombre de famille d'antibiotiques ciblées par au moins un gène ou une mutation de résistance dans les 522 <i>Escherichia coli</i> isolées de bovins en Wallonie sur 3 saisons de vêlage successives (de 2017-2018 à 2019-2020)	129

Résumé - Summary

Résumé

La résistance aux antibiotiques est une préoccupation majeure, qui s'inscrit dans le concept du *One Health*. Les β -lactamines sont fortement utilisées, tant en médecine vétérinaire qu'humaine, et les résistances à ces antibiotiques sont nombreuses et variées. Cette thèse a permis, au travers de plusieurs études, d'aborder différents aspects des résistances aux β -lactamines médiées par des β -lactamases (BLAs) présentes dans des *Escherichia (E.) coli* isolées de veaux diarrhéiques ou septicémiques.

Une première étude sur les phénotypes de résistances d'*E. coli* isolées à l'ARSIA (Association Régionale de Santé et d'Identification Animales) pendant sept saisons de vêlage a permis de suivre l'évolution des différents phénotypes : β -lactamases-à-spectre-restréint (BLSR), β -lactamases-à-spectre-étendu (BLSE), Céphalosporinases (AmpC), BLSR avec une résistance à la céfoxidine (AmpC-like) et carbapénémases (CP). Le nombre d'*E. coli* inclus est variable suivant les différentes saisons de vêlage, avec un nombre médian de 495 *E. coli* par saison et un nombre moyen de 560 *E. coli* par saison. Suite à la publication de l'Arrêté Royal de juillet 2016 (AR-2016), réglementant l'utilisation des antibiotiques classifiés comme « critiques d'utilisation en médecine humaine » en médecine vétérinaire des animaux de production, une diminution globale des résistances aux β -lactamines est observée. L'évolution est lente, mais une diminution des résistances aux céphalosporines est observée au travers des phénotypes BLSE, AmpC et AmpC-like. Cette diminution peut être mise en relation avec l'AR-2016, qui réglemente l'utilisation des céphalosporines de dernières générations. Cependant, les phénotypes BLSR augmentent, ce qui pourrait être lié à l'augmentation de l'utilisation d'antibiotiques « non-critiques » comme traitement de première intention, comme des pénicillines ou des céphalosporines de première génération. Un autre effet visible de l'AR-2016 est l'augmentation du nombre d'antibiogrammes réalisés. En effet, l'AR-2016 impose avant utilisation d'un antibiotique « critique » la réalisation d'un test de sensibilité mettant en évidence la sensibilité de la bactérie suspectée responsable de l'infection à cet antibiotique et l'absence d'alternative, c'est-à-dire l'absence de sensibilité à d'autres antibiotiques « non-critiques ».

La deuxième partie de ce travail, comportant trois études, se concentre sur l'identification des gènes de résistance aux β -lactamines, les gènes *bla*, dans les *E. coli* isolées pendant trois saisons de vêlage. Ces trois études ont étudié respectivement 93, 394 et 522 *E. coli*. Cette identification a été réalisée par différentes méthodes : réaction de polymérase en chaîne (PCR pour *polymerase chain reaction*), micropuces à ADN (MA pour *microarrays*) et séquençage complet du génome (WGS pour *whole genome sequencing*). Cela a permis de mettre en évidence de nombreux gènes *bla*, codant pour différentes BLAs.

Ainsi, les souches productrices de BLSR possèdent majoritairement le gène *bla_{TEM-1}* ou *bla_{OXA-1}*, qui se retrouvent également dans des souches BLSE ou AmpC, alors associés à d'autres gènes *bla*. Le WGS a permis d'identifier de nombreux variants de *bla_{TEM}*, notamment *bla_{TEM-30}*, *bla_{TEM-33}*, *bla_{TEM-35}* et *bla_{TEM-78}* résistants aux inhibiteurs des BLAs, ainsi que *bla_{TEM-52}*, *bla_{TEM-112}* et *bla_{TEM-168}* donnant un phénotype

BLSE. Cependant, les gènes de BLSE les plus fréquents sont les gènes *bla_{CTX-M}*, avec de nombreux variants différents, appartenant à différents groupes de *bla_{CTX-M}* : CTX-M-1, CTX-M-2 ou CTX-M-9. Enfin, les gènes *bla_{CMY-2}* et *bla_{DHA-1}*, codant pour des AmpC ont été détectés en plus faible proportion, concordant avec la faible proportion de souches présentant ce phénotype. Pour finir, le gène *bla_{ampC}* avec des mutations dans son promoteur a été mis en évidence par le WGS. Les mutations détectées (en position -42, -32, -18 et -1) entraînent, à divers niveaux, une surexpression du gène *bla_{ampC}* pouvant conduire à une résistance à certaines céphalosporines. Ces mutations se retrouvent dans presque tous les isolats avec un phénotype AmpC-like.

La troisième partie de ce travail, représentée par la quatrième et dernière étude de cette thèse, s'intéresse aux relations entre les différentes souches bovines. Sur base de 522 séquences d'*E. coli*, obtenues par WGS, présentant des résistances variées aux céphalosporines (BLSE, AmpC et AmpC-like), des analyses ont été réalisées afin de déterminer la phylogénie existante entre ces souches, ainsi que les gènes et mutations de résistance présents. Cette quatrième étude concerne également la deuxième partie de ce travail, avec l'identification de nombreux gènes *bla*. Une grande diversité génétique des *E. coli* isolées a été montrée, avec 7 phylogroupes différents, sur 8 existants actuellement, et de très nombreux profils alléliques (ST pour *sequence types*). Le seul phylogroupe absent est le groupe B2, associé principalement à des infections extra-intestinales chez l'homme, telles que les infections urinaires. Le ST retrouvé en plus grand nombre (174/522) est le ST88, appartenant au phylogroupe C, et connu pour se retrouver chez les bovins.

Ce travail a donc permis d'explorer la problématique de la résistance aux antibiotiques sous plusieurs angles : phénotypique et génétique, mais aussi spatio-temporel, en abordant la répartition géographique ainsi qu'en suivant les résistances sur plusieurs saisons de vêlage consécutives, ce qui apporte une meilleure compréhension des résistances, et représente une base afin de poursuivre la surveillance et l'étude des résistances aux β-lactamines, notamment chez les *E. coli* d'origine bovine.

Summary

Antibiotic resistance is a major concern, which fits into the concept of One Health. β -lactams are widely used, both in veterinary and human medicine, and resistance to these antibiotics is widespread and diverse. Through several studies, this thesis explores different aspects of resistance to β -lactams mediated by β -lactamases (BLAs) in *Escherichia (E.) coli* isolated from calves with diarrhea or septicaemia.

The first study analyses the resistance phenotypes of *E. coli* isolated at ARSIA (the Regional Association for Animal Health and Identification) to follow the evolution of the different phenotypes during seven calving seasons: Narrow-Spectrum- β -Lactamases (NSBL), Extended-Spectrum- β -Lactamases (ESBL), Cephalosporinases (AmpC), NSBL with resistance to cefoxitin (AmpC-like) and carbapenemases (CP). The number of *E. coli* included is variable over the calving seasons, with a median rate of 495 *E. coli* and an average rate of 560 *E. coli*.

Following the publication of the Royal Decree of July 2016 (RD-2016), regulating the use of antibiotics classified as “critical for use in human medicine” in veterinary medicine for production animals, an overall decrease in resistance to β -lactams is observed. The evolution is slow, but a decrease in resistance to cephalosporins is observed through the ESBL, AmpC and AmpC-like phenotypes. This decrease can be related to RD-2016, which regulates the use of last generation cephalosporins. However, NSBL phenotypes are increasing, which could be linked to the increase in the use of "non-critical" antibiotics as first-line treatment, such as penicillins or first generation cephalosporins. Another visible effect of the RD-2016 is the increasing number of sensitivity tests. Indeed, the RD-2016 imposes, before using a "critical" antibiotic, to perform a sensitivity test showing that the bacteria which is suspected to be responsible for the infection is sensitive to this antibiotic and not sensitive to any other “non-critical” antibiotics.

The second part of this work, comprising three studies, focuses on the identification of the β -lactam resistance genes, the *bla* genes, in *E. coli* isolated during three calving seasons. These three studies included respectively 93, 394 and 522 *E. coli*. This identification was carried out by different methods: polymerase chain reaction (PCR), microarrays (MA) and whole genome sequencing (WGS). Numerous *bla* genes were highlighted, encoding different BLAs. Thus, NSBL strains predominantly possess the *bla_{TEM-1}* or *bla_{OXA-1}* gene, which is also found in ESBL or AmpC strains, associated with other *bla* genes. The WGS has identified many *bla_{TEM}* variants, including *bla_{TEM-30}*, *bla_{TEM-33}*, *bla_{TEM-35}* and *bla_{TEM-78}* resistant to BLAs inhibitors (IRT), as well as *bla_{TEM-52}*, *bla_{TEM-112}* and *bla_{TEM-168}* coding for an ESBL phenotype. However, the most common ESBL genes are the *bla_{CTX-M}* genes, with many different variants, belonging to different groups: CTX-M-1, CTX-M-2 or CTX-M-9. Finally, the *bla_{CMY-2}* and *bla_{DHA-1}* genes, encoding AmpC, were detected in a lower proportion, which is consistent with the low proportion of strains exhibiting this phenotype. Finally, the *bla_{ampC}* gene with mutations in its promoter

was identified by the WGS. The mutations detected (in position -42, -32, -18 and -1) yield, at various levels, an overexpression of the *bla_{ampC}* gene which can give a resistance to some cephalosporins. These mutations are found in almost all isolates with an AmpC-like phenotype.

The third part of this work, represented by the fourth and final study, looks at the relationships between the different bovine strains. Based on 522 sequences of *E. coli*, obtained by WGS, presenting various resistances profiles (ESBL, AmpC and AmpC-like), analyses were carried out in order to determine the phylogeny between these strains, as well as the genes and resistance mutations harbored. This fourth study also concerns the second part of this work, with the identification of many *bla* genes. A high genetic diversity in the isolated *E.coli* has been shown, with 7 phylogroups, out of 8 currently existing, and a lot of various sequential types (ST). The only phylogroup absent is the B2 group, mainly associated with extra-intestinal infections in humans, such as urinary tract infections. The most frequent ST (174/522) is the ST88, belonging to phylogroup C, and known to be found in cattle.

This work explores the issue of antibiotic resistance from several aspects: phenotypic and genetic, but also spatio-temporal, by addressing the geographical distribution and following the resistance over several consecutive calving seasons. This provides a better understanding of resistance, and represents a basis for further monitoring and studying the resistance to β-lactams, especially in *E. coli* from bovine.

Préambule

À l'heure actuelle, les résistances aux antibiotiques représentent une menace majeure pour la santé publique. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a d'ailleurs déclaré que la résistance aux antimicrobiens était l'une des 10 plus grandes menaces auxquelles se trouvait confrontée l'humanité. Cette menace ne concerne pas seulement l'être humain, puisque les bactéries résistantes se retrouvent aussi chez les animaux et dans l'environnement. C'est donc une problématique complexe, qui doit être étudiée et surveillée dans sa globalité. L'OMS en association avec l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) et l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et pour l'agriculture (FAO, pour *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) ont ainsi défini plusieurs associations bactéries-résistances à surveiller étroitement, parmi lesquelles figurent les *Escherichia (E.) coli* présentant des résistances aux carbapénèmes et aux céphalosporines de dernières générations.

E. coli est une bonne représentante de cette menace, puisqu'elle se retrouve tant chez les animaux que chez l'être humain et dans l'environnement. Elle peut passer de l'un à l'autre directement (par contact) ou indirectement, par exemple via de la nourriture contaminée, et, ainsi, transmettre certaines de ses propriétés de résistance, mais également de virulence. La problématique des résistances aux antibiotiques dans une espèce bactérienne aussi ubiquiste qu'*E. coli* est une considération majeure pour la santé, qu'elle soit animale, humaine ou environnementale, et s'inscrit donc parfaitement dans le principe d'une seule santé, le *One Health*.

Si l'étude et le suivi phénotypique de ces résistances sont indispensables, tant du point de vue clinique qu'épidémiologique, il est également intéressant de se pencher sur leur l'aspect génétique. En effet, l'une des particularités des bactéries est la capacité d'échanger des gènes, notamment ceux de résistance. Notre sujet d'étude, *E. coli*, n'échappe pas à la règle et sa grande plasticité génétique lui a, ainsi, permis d'acquérir de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques par échanges avec d'autres espèces bactériennes, gènes qui peuvent également subir diverses mutations créant ainsi de nouveaux variants.

Introduction

1. Escherichia coli, une bactérie aux multiples facettes

Tout a commencé en 1885, lorsqu'un pédiatre germano-autrichien répondant au nom de Theodor Escherich a découvert dans des selles de nourrisson une bactérie en forme de bâtonnet. Ce dernier lui donna le nom de *Bacterium coli commune*, soit bacille commun du côlon (Escherich, 1885). Cette bactérie, considérée comme sans grande importance au moment de sa découverte, allait pourtant devenir le modèle bactérien le plus étudié au monde : *Escherichia coli*. Cette appellation lui a été attribuée en 1958 en mémoire du pédiatre (Judicial Commission of the International Committee on Bacteriological Nomenclature, 1958).

1.1 Caractéristiques

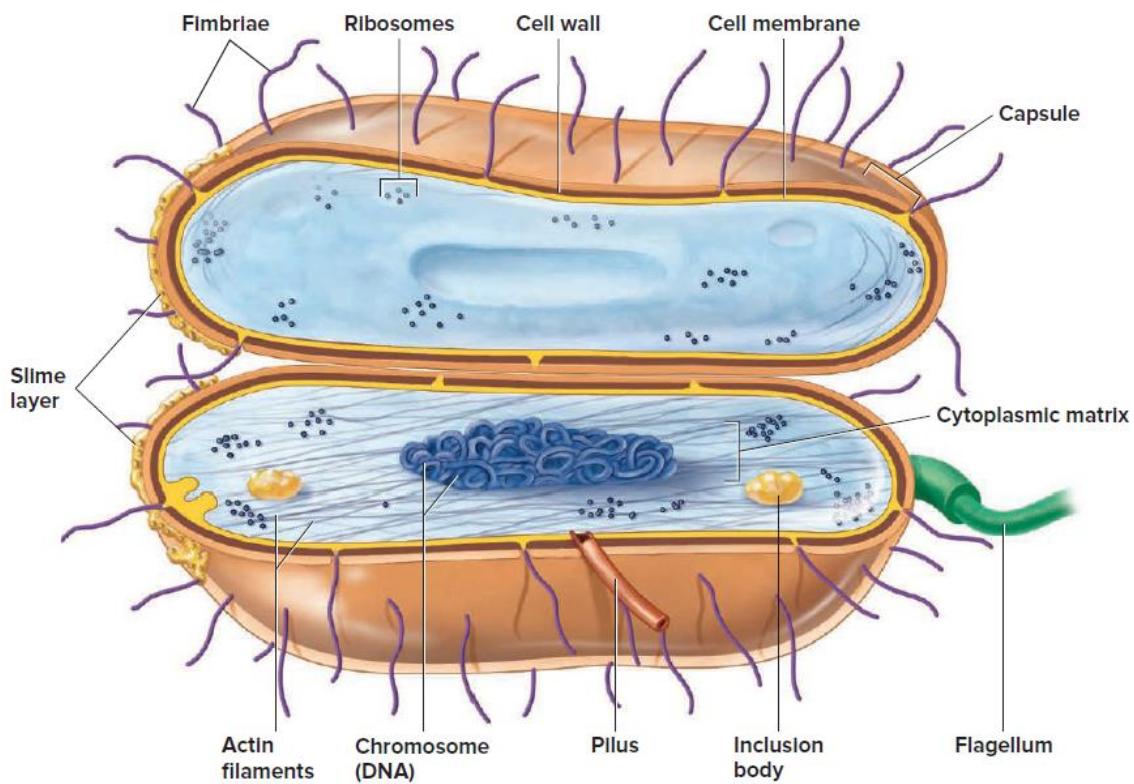
E. coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle est une bactérie Gram négative anaérobie facultative, non sporulante, qui se retrouve principalement dans le microbiote intestinal des vertébrés, mais qui peut être présente dans l'environnement, essentiellement par contamination fécale. Bien que les bactéries anaérobies soient plus nombreuses (de 100 à 10000 fois plus), *E. coli* est la principale espèce aérobie retrouvée dans le tractus gastro-intestinal humain. Elle représente ainsi plus de 90% des bactéries aérobies du microbiote intestinal humain et se retrouve en proportions variables chez les différentes espèces animales (Tenaillon *et al.*, 2010).

1.1.1 Structure

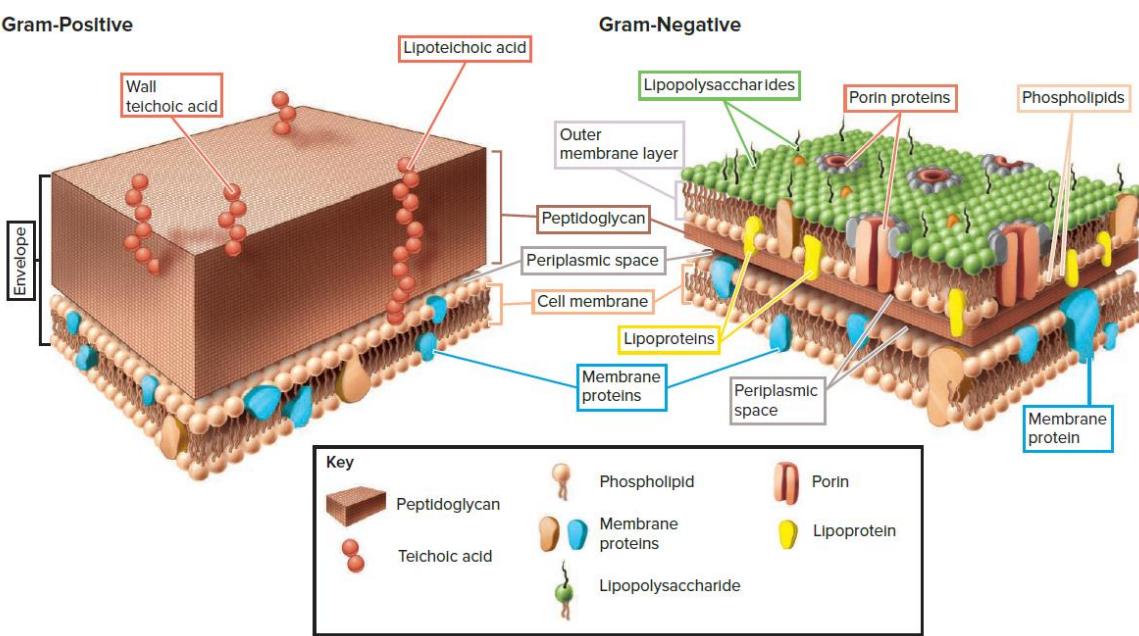
Sa structure est caractéristique des bactéries Gram négatives (Figure 1) : un contenu cytoplasmique renfermant un chromosome circulaire d'acide désoxyribonucléique (ADN) et un ou plusieurs plasmides, entouré d'une première membrane phospholipidique, la membrane interne, puis d'un espace périplasmique où se retrouve la structure en peptidoglycane, elle-même recouverte par une seconde membrane phospholipidique, la membrane externe. Le feuillet externe de cette membrane est composé de molécules de lipopolysaccharide (LPS), qui sont relâchées à la mort de la bactérie, sous forme d'endotoxines. Ces trois couches forment la paroi cellulaire. Certaines *E. coli* expriment également une capsule polysaccharidique. Sur ces membranes s'ancrent des *fimbriae*, des pili et des flagelles, bien que ces derniers ne soient pas toujours présents. Ces structures jouent, principalement, un rôle d'attachement aux muqueuses intestinales, de conjugaison plasmidique et de mobilité bactérienne (Quinn *et al.*, 2016).

Figure 1 : Structure générale d'une bactérie (1a) et comparaison de la structure de la paroi entre bactérie Gram positive et Gram négative (1b).

1a



1b



Source : Talaro et Chess, 2018. Pages 93 et 101.

1.1.2 Pouvoir pathogène

Bien qu'inoffensive la plupart du temps, *E. coli* peut également se révéler pathogène et causer diverses infections spécifiques ou non, comme diarrhées, septicémies, mammites, cystites, pyélonéphrites, méningites ou arthrites. Ce pouvoir pathogène est dû à divers facteurs de virulence, tels que la capacité à coloniser les surfaces muqueuses, l'envahissement de l'hôte, la production de toxines avec par exemple les toxines de Shiga, ou les endotoxines provenant du LPS.

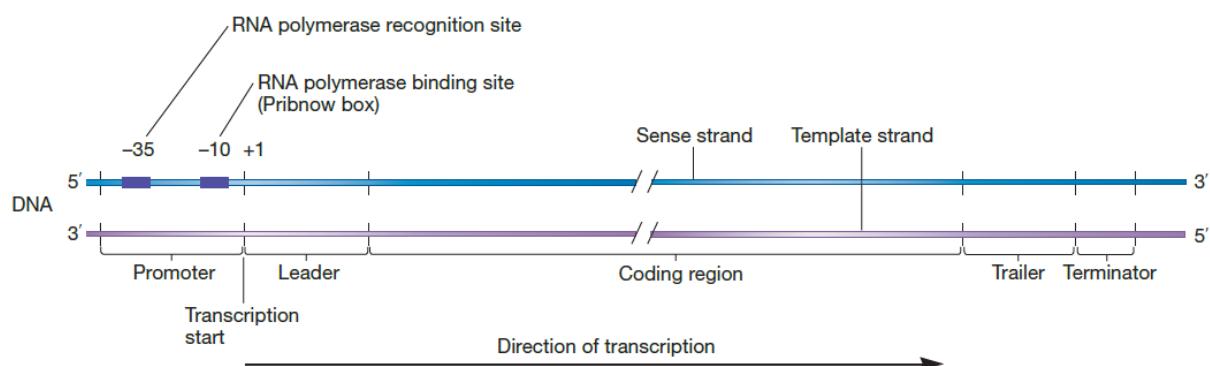
Une liste non-exhaustive de ces facteurs et de leurs effets est présentée dans le tableau I.

1.1.3 Génétique

L'espèce *E. coli* montre une grande variabilité génétique, observable par les différences de taille du génome, allant de 4,2 à 6 Mb avec une taille moyenne de 5 Mb, soit 5 millions de bases (Touchon *et al.*, 2020 ; Bergthorsson et Ochman, 1998). Le génome total, composé d'un chromosome circulaire ainsi que d'un ou plusieurs plasmides, contient en moyenne 5000 gènes, avec une taille moyenne chez les procaryotes de 1000 nucléotides par gène, et environ 4 288 phases ouvertes de lecture (« open reading frames » ou ORF) pour un génome d'une taille de 4,6 Mb (Bernot, 2004).

Une région particulière, appelée promoteur (Figure 2) et située en amont d'un gène, est le site de liaison de l'ARN (acide ribonucléique) polymérase, l'enzyme qui synthétise l'ARN messager (ARNm). Ce promoteur n'est pas transcrit, sa seule fonction est d'orienter l'ARN polymérase pour la transcription du gène. Il est donc situé à une certaine distance du premier nucléotide du gène à transcrire. Deux sites, appelés « boîtes » sont importants sur un promoteur : la boîte -35 qui est le site de reconnaissance de l'ARN polymérase et la boîte -10, qui est le site de liaison de cette ARN polymérase (Willey JM *et al.*, 2017).

Figure 2 : Organisation typique d'un gène bactérien avec les régions importantes du promoteur



Source : Willey *et al.*, 2017. Page 300.

L'une des particularités majeures des bactéries est la capacité à se transmettre des gènes par un transfert horizontal de gènes (THG), qui s'effectue entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse. Contrairement au transfert vertical qui a lieu entre une bactérie « mère » et les bactéries « filles » et est donc lié à la division cellulaire, ce qui donne une transmission clonale, le THG n'est pas lié à cette division et peut même impliquer des bactéries d'espèces différentes. Ces possibilités de transfert concernent de très nombreux gènes, dont ceux codant pour la virulence bactérienne ou la résistance aux antibiotiques.

Le THG peut s'effectuer de trois manières différentes : par conjugaison, avec la transmission d'un plasmide entre bactéries donneuse et receveuse ; par transformation avec l'acquisition d'ADN se trouvant dans l'environnement ; ou par transduction, avec l'intervention d'un phage qui transfère un fragment d'ADN d'une bactérie à une autre (Soucy *et al.*, 2015).

Un autre type de transfert génétique, de grand intérêt dans le cas de la résistance aux antibiotiques et de la virulence, implique des éléments transposables, ou transposons qui sont aussi appelés « gènes sauteurs » (*jumping genes*). En effet, ils peuvent voyager d'un endroit à un autre du génome, c'est-à-dire d'un site chromosomique à un autre, d'un chromosome à un plasmide ou inversement, d'un plasmide à un chromosome. Puisqu'ils peuvent se retrouver sur un plasmide, ils peuvent également être transmis entre bactéries par conjugaison. De plus, certains transposons, appelés transposons réplicatifs, se répliquent avant qu'une des copies se déplace, il y a donc une augmentation du nombre de copies de ce transposon dans le génome.

Ces transposons contiennent des séquences d'ADN qui codent pour les enzymes nécessaires à leur excision du génome et à leur réintégration à un autre site. Flanquant la région codante de l'ADN se trouvent des séquences inversées et répétées, qui marquent les extrémités du transposon.

Le dernier élément génétique pouvant porter des gènes de résistance aux antibiotiques est un segment d'ADN appelé « intégron ». Un intégron se compose d'un gène codant pour une intégrase (*intI*), d'un site de recombinaison (*attI*) et d'un promoteur qui pilote la transcription d'une ou plusieurs « cassettes de gènes » qui ont été capturées par l'intégron. Ces cassettes portent généralement un seul gène de résistance et ont un site de recombinaison appelé *attC* qui interagit avec le site *attI*. Un intégron peut ainsi porter plusieurs cassettes de résistance. Si une cassette de gène est capturée par un intégron situé dans un plasmide conjugal, elle peut être transférée à d'autres cellules par conjugaison. Dans le cas des résistances aux β-lactamines, la carbapénémase VIM pour *Verona Integron-Mediated Metallo-β-lactamase*, tire partiellement son nom de cette localisation génétique.

1.2 Diversité et classification

La grande variabilité génétique de l'espèce *E. coli* rend la classification des différentes souches quelque peu difficile. Ainsi, plusieurs classifications ont été proposées, se basant sur des caractéristiques variées, afin de regrouper les différents types d'*E. coli*. Les deux premières se basent sur des caractéristiques phénotypiques, même si elles sont déterminées sur base du matériel génétique, tandis que les deux suivantes se basent exclusivement sur le matériel génétique présent dans la bactérie. Ces classifications sont brièvement décrites ci-dessous, car une description détaillée dépasse le cadre de ce travail.

1.2.1 Sérotypes

Ces groupes sont déterminés principalement par les antigènes somatiques portés par le LPS (O) et flagellaires (H), mais aussi par les antigènes capsulaires (K) et fimbriaux (F). Chaque sérotype est désigné par les numéros des antigènes qu'il exprime (Quinn *et al.*, 2016). Par exemple, O157:H7, pour l'antigène somatique O type 157 et l'antigène flagellaire type 7 (Talaro et Chess, 2018). Il existe un nombre considérable de combinaisons puisqu'il y a près de 200 antigènes O, environ 70 antigènes K, 50 antigènes H et quelques antigènes F (Joensen *et al.*, 2015 ; Mainil et Fairbrother, 2014).

1.2.2 Pathotypes

Cette classification se base sur les lésions causées par la bactérie, mais également sur les facteurs de virulence (FV) qu'elle possède. La principale division se retrouve entre les *E. coli* pathogènes causant des infections intestinales et celles provoquant des infections extra-intestinales, telles que septicémie, infection urinaire ou mammaire. Ces pathotypes sont présentés dans le tableau I. Bien que certains FV sont associés à des pathotypes particuliers, la différenciation des souches d'*E. coli* est complexe et nombre d'*E. coli* commensales, non-pathogènes, possèdent aussi plusieurs de ces FV. Certains de ces facteurs peuvent être détectés « phénotypiquement », comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit, mais il existe aussi des techniques d'identification basées sur le matériel génétique de la bactérie (Mainil et Fairbrother, 2014).

1.2.3 Profils alléliques ou sequence types (ST)

Cette classification est effectuée sur base du MLST pour *multilocus-sequence-typing*. Cette technique de typage cible pour *E. coli* 7 gènes « de ménage », *housekeeping genes*, et les différences observées dans les séquences de ces gènes cibles permettent de classifier les bactéries. Ces gènes sont identifiés par des réactions de polymérase en chaîne (PCR pour *polymerase chain reaction*), mais peuvent aussi être identifiés *in silico*, sur base des séquences génomiques. À l'heure actuelle, suite au développement du séquençage complet du génome, les analyses sont également faites sur le *core genome* (analyse du cgMLST), le génome cœur, constitué par l'ensemble des gènes communs aux souches d'une même espèce bactérienne, ou le génome complet (analyse du wgMLST), constitué par l'ensemble des gènes de la souche étudiée, et en fonction de l'identité des gènes, un profil allélique (ST pour *sequence type*) et un complexe clonal (CC) sont attribués à la souche étudiée (Quainoo *et al.*, 2017).

Tableau I : Pathotypes d'*Escherichia coli* et facteurs de virulence associés pouvant être détectés chez les bovins ou chez l'homme, adapté de Mainil et Fairbrother, 2014

Classification	Name (acronym)	Primary hosts	Secondary hosts	Clinical signs and diseases	Most relevant virulence properties
Diarrhoeagenic <i>E. coli</i> (DEC)	Enterotoxigenic (ETEC)	Ruminants, pigs, dogs, humans	/	Watery diarrhoea in newborn (ruminants, piglets, pups, babies); travellers' diarrhoea	Fimbrial adhesins (F2 to F6, F17a, F18, F41); afimbrial adhesin (AIDA, Adhesin Involved in Diffuse Adherence); heatstable (STa, STb) and heat-labile (LT1, LT2) enterotoxins; α -haemolysin (α -Hly)
	Enteropathogenic (EPEC)	All mammals, including humans	/	Undifferentiated diarrhoea	Attaching and effacing (AE) lesion; type 4 "Bundle Forming Pili" (BFP) fimbriae of human typical (t)EPEC
	Attaching/Effacing VeroToxigenic (AE-VTEC)	Young ruminants, especially calves	/	Undifferentiated acute or chronic diarrhoea	AE lesion; Verotoxins (VTx) play no role in ruminants
	NecroToxigenic (NTEC)	NTEC1: all mammals, including humans; NTEC2: ruminants	/	Diarrhoea and extra-intestinal infections (urinary tract infections, septicaemia)	Cytotoxic Necrotising Factors (CNF) 1/2; Cytolethal Distending Toxin III (CDT-III); α -Hly; fimbrial (Pap/Prs, Sfa/F1C and F17b/c) and afimbrial adhesins (AFA family)
	Diffusely Adherent (DAEC)	Animals, humans	/	Diarrhoea & extra-intestinal infections (urinary tract infections, septicaemia)	AFA family and AIDA
	Enteroinvasive (EIEC)	Humans, primates	/	Dysentery	Invasion of and multiplication in the enterocytes

	Enterotoxigenic (EAggEC)	Humans	/	Diarrhoea	Fimbrial adhesins (AAF/Hda); toxins (Pet, EAST, ShET1); transcriptional activator gene (<i>aggR</i>)
Enterotoxaemic <i>E. coli</i>	Attaching / Effacing VeroToxigenic (AE-VTEC)	Humans	Dogs	Diarrhoea, haemorrhagic colitis (HC), haemolytic uremic syndrome (HUS)	AE lesion; Verotoxins (Vtx) 1/2
	VeroToxigenic (VTEC)	Pigs, humans	Ruminants = healthy carriers of human VTEC	Oedema disease (ED) in piglets; HUS in humans	Vtx 1/2; fimbrial (F18 of porcine VTEC) and afimbrial (Saa of human) adhesins
Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> (ExPEC)	SePticaemic (SePEC)	Ruminants	other mammals	Septicaemia, bacteraemia, multi-systemic infection, endotoxaemia	Pap/Prs, Sfa/F1C, F17b/c, AFA-VIII, CS31A adhesins; CNF 1/2, CDT-III/IV and α -Hly toxins; endotoxin; blood vessel barrier crossing (IbeA); antiphagocytosis (O and K antigens); resistance to complement (Iss, TraT); iron-scavenging systems (aerobactin, yersiniabactin, salmochelin);
	UroPathogenic (UPEC)	Humans, dogs, cats	other mammals	Cystitis, pyelonephritis (bacteraemia, septicaemia)	

1.2.4 Phylogroupes

Également basé sur le génome d'*E. coli*, il existe 8 phylogroupes principaux : A, B1, B2, C, D, E, F et G (Clermont *et al.*, 2019). Ces phylogroupes correspondent à des lignages phylogénétiques majeurs et peuvent être identifiés par PCR multiplex ou *in silico* sur base des séquences génomiques (Beghain *et al.*, 2018 ; Clermont *et al.*, 2013). Les quatre phylogroupes comportant la majorité des souches d'*E. coli* sont les groupes A, B1, B2 et D, tandis que les quatre autres sont plus rares. De fait, les phylogroupes A et B1 sont les plus généralistes car ils se retrouvent chez tous les vertébrés et parfois dans l'environnement (Touchon *et al.*, 2020). Ces phylogroupes sont associés à certains hôtes ou à un environnement spécifique. Cette classification est très utile d'un point de vue épidémiologique, puisque la prévalence des phylogroupes varie selon l'espèce considérée. Ainsi, chez l'être humain, les *E. coli* du groupe A sont prédominantes (40,5%), suivies par le groupe B2 (25,5%), tandis que chez les autres mammifères, c'est le groupe B1 qui domine (41%), suivi par le groupe A (22%) et B2 (21%) (Beghain *et al.*, 2018). De plus, dans l'espèce humaine, le phylogroupe B2 semble associé aux *E. coli* pathogènes extra-intestinales, tandis que les phylogroupes A et B1 semblent plutôt commensaux (Touchon *et al.*, 2020 ; Duriez *et al.*, 2001).

1.3 *Escherichia coli* en tant qu'agent pathogène chez les bovins

E. coli est une bactérie normale de la flore digestive, mais elle peut être impliquée dans de nombreuses pathologies (*Cf. point 1.1.2*) tant chez l'homme que les animaux. Chez les bovins elle est surtout associée aux diarrhées et septicémies néonatales. Elle se retrouve aussi dans des infections extra-intestinales chez l'adulte, souvent dues à une infection opportuniste, au niveau des glandes mammaires, de l'utérus ou du tractus urinaire (Quinn *et al.*, 2016).

1.3.1 Facteurs prédisposant des veaux

Les nouveau-nés sont plus sensibles aux infections pour plusieurs raisons. Leur immunité n'est pas développée dans les premières semaines de vie, et ils dépendent de l'immunité transmise par le colostrum, pour lutter contre les infections. Cette immunité peut être déficiente, soit par un manque d'absorption du colostrum, soit par une mauvaise qualité de ce dernier. L'absorption du colostrum dépend du moment où ce dernier est donné au veau, mais également de l'état de celui-ci. En effet, il y a une phase d'absorption active, et un veau en mauvais état général absorbera moins bien le colostrum qu'un veau en pleine santé. La qualité immunitaire du colostrum est liée aux anticorps, mais également aux cellules immunitaires qu'il contient. Ainsi, un colostrum congelé sera de moindre qualité puisque ces cellules ne seront plus présentes (Gonzalez et Dus Santos, 2017 ; Reber *et al.*, 2008 a et b).

Avant la première semaine de vie, la flore commensale n'est pas encore totalement établie, et la colonisation par des bactéries pathogènes est alors plus facile, d'autant plus que certains récepteurs ciblés par les adhésines des *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) ne sont présents que durant cette première semaine de vie (Markey *et al.*, 2013).

Des facteurs supplémentaires, tels qu'un élevage intensif ou le manque d'hygiène, augmentent également le risque d'infection par des *E. coli* pathogènes, via une transmission plus rapide et/ou un plus grand nombre de bactéries transmises, qui peuvent dès lors surpasser l'immunité colostrale (Markey *et al.*, 2013).

1.3.2 Infections par *E. coli* chez les veaux

La contamination des veaux peut se faire via la voie féco-orale, après excrétion des *E. coli* pathogènes par les bovins adultes. Ensuite, les veaux malades présentant de la diarrhée vont accroître la contamination de l'environnement, via leurs excréptions fécales. En effet, les ETEC sont commensales chez les bovins adultes, et l'infection peut donc se faire par transmission de la mère à son veau. Pour améliorer l'immunité du veau contre ces ETEC, une vaccination de la mère pendant la gestation existe. Cependant, cela n'a d'intérêt que si le veau reçoit le colostrum de sa mère, ce qui permet la transmission de l'immunité envers ces ETEC (Gonzalez *et al.*, 2021).

Cependant, les diarrhées néonatales sont plurifactorielles, et il n'est pas aisés d'en déterminer la cause. Elles peuvent être liées à des facteurs environnementaux, nutritionnels ou de management aussi bien qu'à des agents pathogènes (McGuirk, 2008). Les pathogènes majeurs associés aux diarrhées des veaux sont les cryptosporidies, les rotavirus et coronavirus, ainsi que les ETEC et les Salmonelles. Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* productrices de Shiga-toxine (STEC) et les *E. coli* attachant-effaçant (AEEC) peuvent également être impliquées dans les diarrhées, mais leur importance réelle est inconnue à cause du manque de test approprié pour le diagnostic de routine, mais également à cause de la prévalence d'*E. coli* verotoxinogènes (VTEC) chez les animaux sains, ce qui complique l'interprétation de la détection des *E. coli* dans les matières fécales (MF) des animaux malades (Smith *et al.*, 2019). Ces diarrhées infectieuses représentent la cause majeure de mortalité chez les veaux de 3 à 21 jours et les pathogènes impliqués varient en fonction de l'âge du veau.

Quant aux septicémies, elles sont la troisième cause de mortalité, après les pathologies respiratoires. Les cultures sanguines montrent une prévalence de 80% de bactéries à Gram négative, où les *E. coli* sont majoritaires, et isolées dans plus de 50% des cas de septicémies (Smith *et al.*, 2019).

En Belgique, la mortalité liée aux troubles digestifs est fortement présente chez les veaux de moins de six mois, ces derniers représentant 83% des cas de mortalité liée aux troubles digestifs présents en autopsie. Les *E. coli* sont isolées dans 41% des prélèvements chez les veaux de moins d'un mois, alors qu'elles se retrouvent dans près de 25% chez les veaux d'un à six mois. *E. coli* est isolée dans 80% des cas de septicémie, qui concernent majoritairement les veaux de moins de 30 jours (ARSIA, 2020).

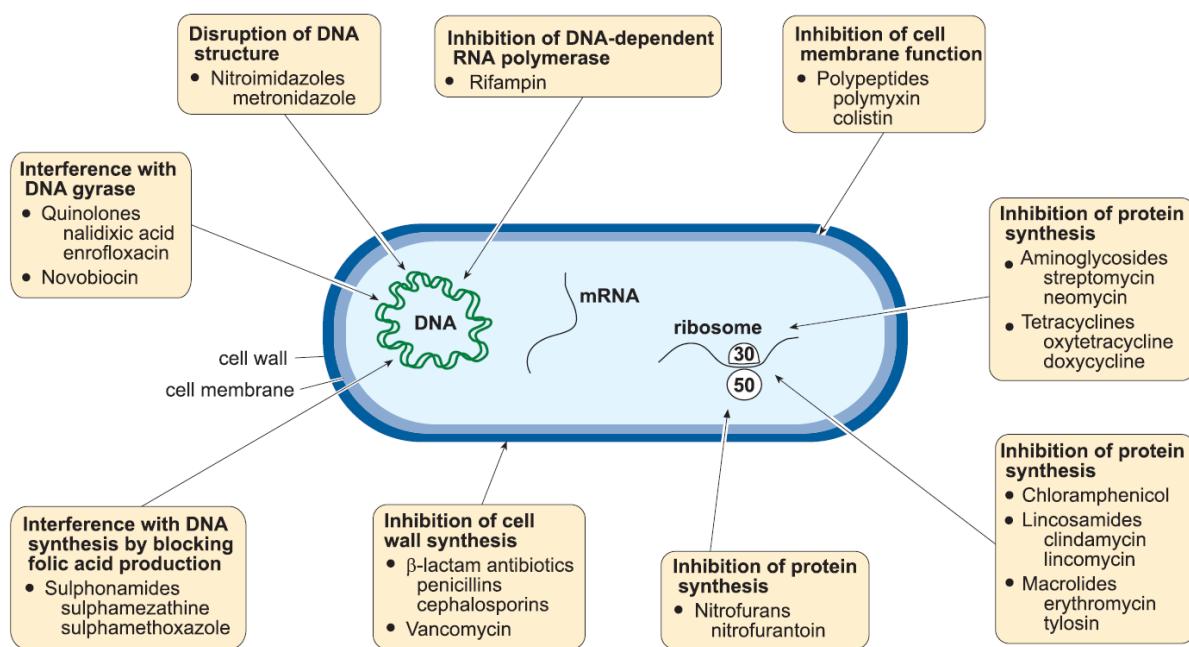
2. Antibiotiques et résistance bactérienne : principes généraux

Bien qu'il existe de nombreuses familles d'antibiotiques, une proportion importante de bactéries est aujourd'hui multi-résistante, c'est-à-dire qu'elles présentent des résistances à au moins trois familles différentes d'antibiotiques (EFSA, 2020 ; Magiorakos *et al.*, 2012). Ceux-ci peuvent être regroupés selon leur similarités chimiques ou leur mode d'action. Pour chaque action antibactérienne, il peut exister une réponse de la bactérie lui permettant d'éviter ou de contrer l'antibiotique. Ils seront brièvement présentés dans cette section.

2.1 Modes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent avoir un effet bactéricide, entraînant la mort des bactéries, ou bactériostatique, empêchant la croissance et la multiplication des bactéries. Les différents modes d'action sont présentés dans cette section, ainsi que dans la figure 3, qui y associe les familles d'antibiotiques correspondantes.

Figure 3 : Sites d'action et effet des différentes familles d'antibiotiques



Source : Quinn *et al.*, 2016. Page 18.

2.1.1 Action sur la paroi ou les membranes bactériennes

Deux types d'action ayant un effet bactéricide sont possibles. La première concerne l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane ou de ses liaisons avec d'autres composants de la paroi. La deuxième est l'interférence avec la membrane externe des bactéries Gram négatives et la membrane cytoplasmique de toutes les bactéries, ce qui entraîne une incapacité de la bactérie à conserver son homéostasie (Giguère *et al.*, 2013 ; Quinn *et al.*, 2016).

2.1.2 Action sur l'ADN : réparation, réPLICATION, transcription

Plusieurs antibiotiques ont un effet direct ou indirect sur l'ADN bactérien. Selon le site d'action, ces antibiotiques ont un effet bactéricide ou bactériostatique. En empêchant la réPLICATION de l'ADN, la bactérie n'est plus capable de se multiplier et de se diviser. Lorsque l'antibiotique agit au niveau de la transcription, la bactérie n'est plus capable de former les ARNm et ne pourra, donc, plus synthétiser de protéines. Certains antibiotiques agissent en amont, en inhibant l'acide folique, précurseur des nucléotides, ce qui empêche *de facto* la réparation, la réPLICATION et la transcription de l'ADN (Giguère *et al.*, 2013 ; Quinn *et al.*, 2016).

2.1.3 Action sur la synthèse des protéines

Ces antibiotiques interagissent directement avec l'une des sous-unités du ribosome, qui traduit normalement l'ARNm en protéines, ou avec un ARN de transfert (ARNt), qui « véhicule » vers le ribosome les acides aminés qui seront ajoutés à la chaîne polypeptidique en formation. Ces interactions bloquent la formation des protéines et peuvent avoir un effet bactéricide ou bactériostatique (Giguère *et al.*, 2013 ; Quinn *et al.*, 2016).

2.2 Mécanismes de résistance utilisés par les bactéries

En premier lieu, il faut différencier la résistance intrinsèque ou innée de la résistance extrinsèque ou acquise. En effet, la première est liée aux caractéristiques de la bactérie. Par exemple, si un antibiotique inhibant la synthèse du peptidoglycane (comme la pénicilline) est utilisé sur une bactérie qui ne possède pas cette couche de la paroi, il n'aura aucun effet. La bactérie est intrinsèquement résistante à cet antibiotique. Un autre exemple, est celui des premières β-lactamines, comme la pénicilline G, qui sont inactives sur les bactéries Gram négatives puisqu'elles sont incapables de traverser efficacement la membrane externe et, donc, d'atteindre leur cible, les enzymes de synthèse du peptidoglycane, située entre les deux membranes phospholipidiques (Hancock, 1997).

Pour les résistances acquises, différents mécanismes sont observés chez les bactéries, mais tous proviennent soit de mutations dans des gènes bactériens existants, soit d'une acquisition de gènes de résistance à partir d'autres bactéries. Bien souvent, il y a plus d'un mécanisme qui intervient, ce qui confère un avantage à la bactérie, puisqu'elle multiplie ainsi ses chances de résister à un antibiotique donné. En effet, en cas de perte ou d'inhibition de l'un des mécanismes, un autre peut prendre la relève. Ainsi, une bactérie peut produire une enzyme qui inactive l'antibiotique tout en ayant également des pompes à efflux ou des modifications de la perméabilité de sa membrane. Si l'enzyme est inactivée par un inhibiteur, les pompes à efflux ou la perméabilité modifiée permettent encore à la bactérie de résister à l'antibiotique. De plus, la combinaison de ces différents mécanismes entraîne un plus haut niveau de résistance pour un antibiotique donné, puisque ce dernier est ciblé par différents mécanismes de défense de la part de la bactérie. Si la bactérie combine une modification de sa perméabilité membranaire avec une enzyme d'inactivation de l'antibiotique, elle cumule deux mécanismes de résistance. Donc, non

seulement l'antibiotique aura plus de difficulté à atteindre sa cible, mais en plus, les molécules qui passeront la première défense, la perméabilité membranaire diminuée, devront faire face à l'enzyme capable d'inactiver l'antibiotique. Les molécules d'antibiotiques se retrouvent en quantité plus faible, ce qui facilite le travail de l'enzyme d'inactivation. La combinaison des mécanismes entraîne donc un plus haut niveau de résistance que ces mêmes mécanismes considérés séparément (Wax *et al.*, 2008).

2.2.1 Mutation de la cible ou stratégie d'évitement

En modifiant la cible de l'antibiotique, la bactérie fait en sorte que ce dernier ne puisse plus la reconnaître. L'antibiotique ne se liant pas à sa cible, il n'est pas capable d'agir. La bactérie peut aussi mettre en place une stratégie d'évitement, en développant une voie métabolique alternative à celle bloquée par l'antibiotique. Dans ce cas, l'antibiotique est actif, mais ne joue plus son rôle, puisque la bactérie produit autrement ce dont elle a besoin pour vivre (Giguère *et al.*, 2013 ; Quinn *et al.*, 2016).

2.2.2 Modification de la perméabilité membranaire (porine)

En réduisant la perméabilité membranaire, la bactérie limite ou empêche l'entrée de l'antibiotique dans le périplasme et/ou le cytoplasme. Ce dernier ne pouvant atteindre son site d'action, il devient inefficace (Giguère *et al.*, 2013 ; Quinn *et al.*, 2016).

2.2.3 Expulsion de l'antibiotique (pompes à efflux)

Dans ce cas, l'antibiotique entre dans le cytoplasme, mais avant d'avoir pu exercer son action, il est « expulsé » dans le milieu extérieur par une pompe à efflux, soit non spécifique et présente de manière physiologique, soit spécifique et synthétisée par des gènes nouvellement acquis. La synthèse et l'utilisation de ces pompes à efflux spécifiques demandent de l'énergie à la bactérie, mais lui permettent de ne pas subir l'action de l'antibiotique et, donc, de survivre (Cattoir, 2004).

2.2.4 Production d'une enzyme agissant sur l'antibiotique

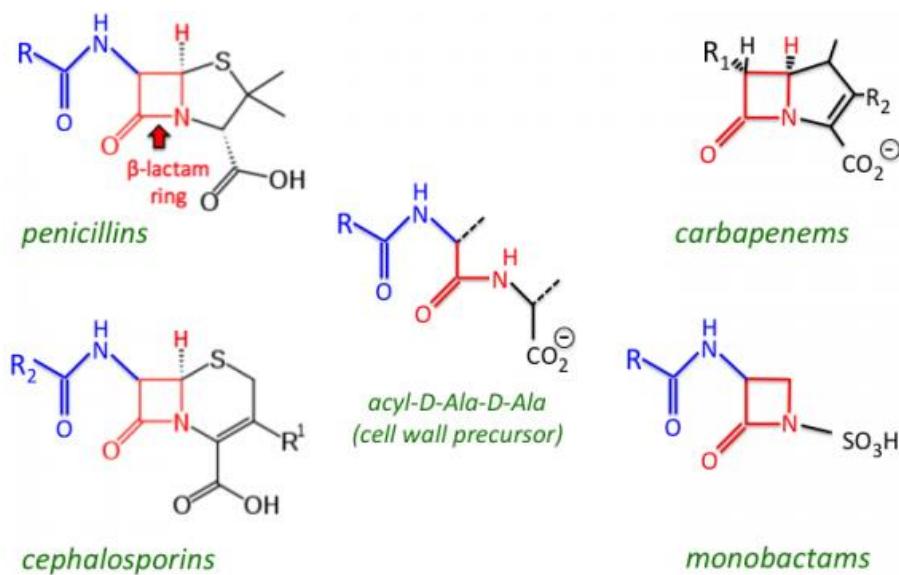
La production par la bactérie d'une enzyme capable d'inactiver l'antibiotique est médiée par des gènes nouvellement acquis dans la grande majorité des cas (Giguère *et al.*, 2013 ; Quinn *et al.*, 2016). Cette dernière catégorie est la plus fréquente et, aussi, celle qui nous intéressera dans la suite de ce travail avec les enzymes β -lactamases (BLAs).

3. β -lactamines et résistances aux β -lactamines

3.1 Les β -lactamines

Les antibiotiques de la famille des β -lactamines, également appelés β -lactames, sont répartis en plusieurs classes : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames (Hamed *et al.*, 2013). Tous possèdent un cycle β -lactame, d'où la famille tient son nom (Figure 4). Ce cycle leur confère une activité bactéricide par inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Leurs cibles précises sont des transpeptidases, également appelées protéines liant la pénicilline (PBPs pour *Penicillin Binding Proteins*), qui créent les liaisons covalentes entre les chaînes de peptidoglycane (Figure 5) (Talaro et Chess, 2018). Les β -lactamines ne sont donc efficaces que sur les bactéries en croissance, lorsque cette synthèse est la plus active. Chez les bactéries Gram positives, les β -lactamines peuvent atteindre directement leurs cibles, tandis que chez les bactéries Gram négatives, elles doivent franchir la membrane externe pour atteindre leurs cibles situées dans le périplasme (Figure 1b).

Figure 4 : Structure des antibiotiques de la famille des β -lactamines et similarité avec la séquence peptidique D-Ala-D-Ala



En rouge, le cycle β -lactame, commun à toutes les classes. Ce cycle mime la forme de la séquence peptidique D-Ala-D-Ala terminale (en rouge, au centre de la figure), le substrat des protéines liant la pénicilline qui forment les liaisons entre les molécules de peptidoglycane lors de la synthèse de la paroi cellulaire. En bleu, la similitude des chaînes latérales, induisant une liaison étroite qui inhibe l'activité enzymatique et donc la formation de la paroi cellulaire. La flèche rouge représente la liaison hydrolysée par les β -lactamases.

Source : http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/betalactam_pharm

Figure 5 : Structure (5a et b) et formation du peptidoglycane, par la transpeptidation et inhibition de la réaction par les β -lactamines (5c)

5a

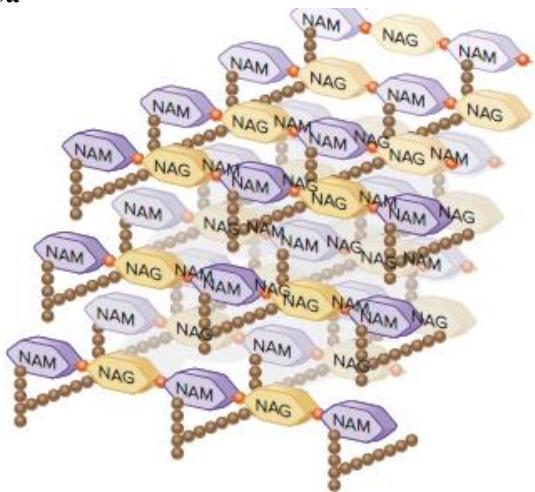
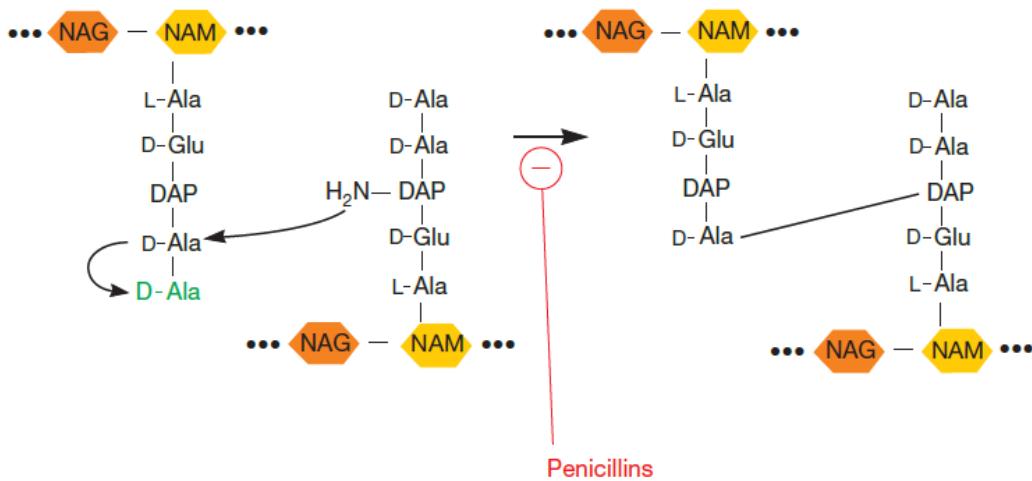


Schéma moléculaire du peptidoglycane. Alternance entre les molécules de glycane (NAG : N-acétylglucosamine et NAM : acide N-acétylmuramique), liées en longs brins. Les NAM adjacents sur les chaînes parallèles sont liés par un pont peptidique (représenté par les sphères brunes).

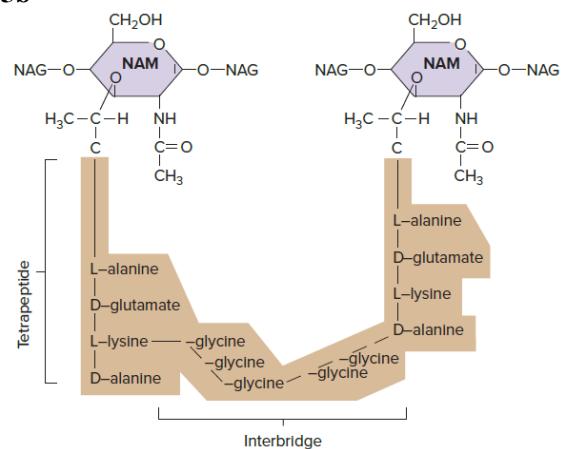
5c

E. coli transpeptidation



Réaction de transpeptidation permettant la formation des plans de peptidoglycane, la molécule de D-Ala terminale (en vert) est ôtée durant la liaison. La pénicilline et autres β -lactamines agissent à cette étape pour inhiber la réaction, en remplaçant la chaîne terminale D-Ala-D-Ala. NAG : N-acétylglucosamine. NAM : acide N-acétylmuramique. DAP : acide diaminopimélique.

5b



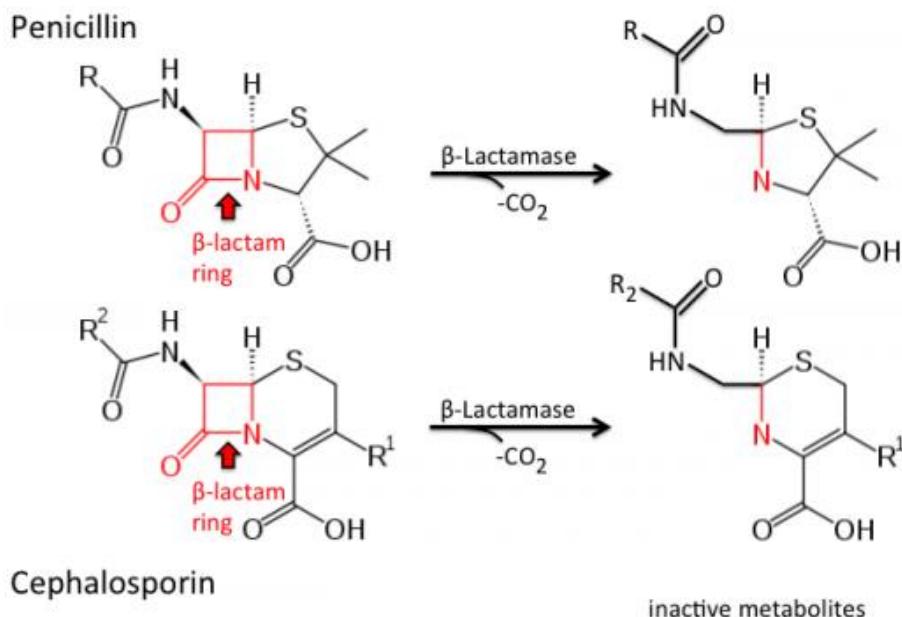
Représentation plus détaillée du pont peptidique entre deux molécules de NAM.

Sources : 5a et b. Talaro et Chess, 2018. Page 100.

5c. Willey *et al.*, 2017. Page 270

Cependant, le cycle β -lactame est sensible à l'hydrolyse par des enzymes (Figure 6), les β -lactamases, qui inactivent ces antibiotiques (Willey *et al.*, 2017). Les BLAs sont sécrétées dans le périplasme par de nombreuses bactéries Gram négatives, leur conférant une résistance variable selon le type d'enzyme, comme nous le verrons plus loin dans ce document. Voici une présentation résumée des quatre classes précitées de β -lactamines.

Figure 6 : Hydrolyse par les β -lactamases du cycle β -lactame



La β -lactamase utilise une molécule d'eau (H_2O) pour hydrolyser le cycle β -lactame (en rouge) de l'antibiotique au niveau de la liaison azote-carbone (flèche rouge). L'ouverture de ce cycle rend l'antibiotique inactif. Pendant cette réaction, il y a libération d'un proton H^+ dans le milieu extérieur, puis d'un CO_2 qui provient de la forme hydrolysée de l'antibiotique.

Source de l'image : http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/betalactam_pharm

3.1.1 Pénicillines

Les pénicillines naturelles (la pénicilline G ou benzylpénicilline découverte par Fleming et la pénicilline V ou phénoxyméthylpénicilline) possèdent un spectre antibactérien étroit, limité aux bactéries Gram positives. La synthèse de nouvelles pénicillines, dites semi-synthétiques (amino-, carboxy-, aminido- et acyluréido-pénicillines), a permis d'élargir le spectre d'action aux bactéries Gram négatives, et certaines sont aussi résistantes aux BLAs. Un groupe de pénicillines naturellement résistantes aux BLAs dirigées contre les pénicillines (ou pénicillinases) existe : il s'agit de l'oxacilline et de ses dérivés semi-synthétiques. De plus, l'association d'un inhibiteur chimique des BLAs (groupe des oxapénèmes) aux pénicillines permet également d'éviter l'inactivation de l'antibiotique. Cette association se retrouve notamment avec l'amoxicilline, une aminopénicilline, sous la formulation d'amoxicilline associée à de

l'acide clavulanique (CBIP, 2021). Les pénicillines sont très largement utilisées en médecine humaine, notamment via l'amoxicilline, associée ou non à l'acide clavulanique (ECDC, 2020a). En Belgique, trois groupes sont autorisés pour une utilisation en médecine vétérinaire : les pénicillines naturelles (comme la pénicilline G), les aminopénicillines (comme l'ampicilline), en association éventuelle avec un inhibiteur des BLAs (comme l'acide clavulanique), et les pénicillines résistantes aux pénicillinases. Ce dernier groupe est uniquement représenté par la cloxacilline pour une utilisation topique en intramammaire (CBIPvet, 2021). En médecine humaine, il n'existe plus de spécialité à base d'oxacilline, la seule molécule disponible est la flucloxacilline (CBIP, 2021).

3.1.2 Céphalosporines

À la différence des pénicillines, la classification des nombreuses céphalosporines se fait par génération, ce qui correspond à une chronologie de mise sur le marché et, partiellement, à une approche du spectre d'action. Une seconde classification basée sur le spectre d'action, avec une répartition en groupes, existe depuis quelques temps. D'un grand intérêt en clinique (CBIPvet, 2021), elle est cependant rarement utilisée en recherche. A l'origine, les céphalosporines sont moins sensibles que les pénicillines à la dégradation par les BLAs de type pénicillinases et peuvent donc être actives contre certaines souches productrices de pénicillinases. Cette faculté est de plus en plus marquée avec la génération à laquelle la céphalosporine appartient. Néanmoins, l'évolution et les mutations ont permis l'apparition d'enzymes BLAs incluant de nombreuses céphalosporines dans leur spectre d'inactivation. Les céphalosporines de 1^{ère} génération (C1G) ont un spectre semblable à celui des pénicillines naturelles tandis que celles de 2^{ème} génération (C2G) se rapprochent des amino-pénicillines, avec un spectre étendu à de nombreuses bactéries Gram négatives. Les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) ont aussi un spectre étendu et certaines possèdent une activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et les céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G) possèdent un spectre renforcé. Les C4G sont, en effet, moins sensibles à un certain nombre de BLAs et possèdent une meilleure activité sur les staphylocoques (CBIP, 2021). Ces deux dernières générations font partie des antimicrobiens classés comme critiques et leur usage en médecine vétérinaire est, aujourd'hui, déterminé par un cadre légal en Belgique (Arrêté Royal du 21 juillet 2016), afin de minimiser les risques de développement de résistances. Les céphalosporines de 5^{ème} génération (C5G) ne sont pas répertoriées pour une utilisation en médecine vétérinaire (CBIPvet, 2021).

3.1.3 Carbapénèmes

Ces antibiotiques possèdent un spectre antibactérien extrêmement large et sont actifs sur la plupart des bactéries Gram positives et Gram négatives. Ils sont utilisés contre des bactéries résistantes aux deux classes précédemment décrites, les pénicillines et les céphalosporines, puisqu'ils restent actifs contre les bactéries productrices de β-lactamases-à-spectre-étendu (BLSE) (*Cf.* point 3.2.2). Cependant, ils peuvent être inhibés par des enzymes appelées carbapénémases (CP) (CBIP, 2021). Aucune spécialité appartenant à cette classe n'est disponible en médecine vétérinaire.

3.1.4 Monobactames

Il n'existe qu'une molécule à ce jour, l'aztréonam, qui est un antibiotique β -lactame monocyclique. Cette particularité le rend très résistant à l'hydrolyse par les BLAs (Azactam, RCP), mais il reste hydrolysable par les BLSE et CP (Cayston, RCP). Il n'est actif que contre les bactéries aérobies Gram négatives (CBIP, 2021). Tout comme les carbapénèmes, cette classe n'est pas disponible pour un usage vétérinaire.

3.2 Les β -lactamases

Si la résistance aux β -lactamines chez les bactéries Gram négatives est majoritairement due à la sécrétion des enzymes BLAs, qui hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame (Figure 6), elle peut également être due à la modification de la cible, les PBPs, à la modification de la perméabilité de la membrane externe des bactéries Gram négatives et/ou à des pompes à efflux générales ou spécifiques (Hamed *et al.*, 2013). Ces autres modes de résistance ne seront cependant pas abordés plus en détails dans ce travail.

Un peu plus d'une dizaine d'années après la découverte de la pénicilline (Fleming, 1929), la première mention d'une BLA chez *E. coli* est faite par Abraham et Chain en 1940, dans leur lettre à l'éditeur de *Nature* intitulée « An enzyme able to destroy penicillin ». Les résistances acquises par production de BLAs ont ensuite évolué parallèlement au développement des β -lactamines. C'est ainsi que de nombreuses autres BLAs conférant différents spectres d'inactivation des β -lactamines, ont peu à peu été décrites dans les entérobactéries et peuvent être regroupées en 4 classes phénotypiques sur base de leur spectre d'inactivation. Dans l'intérêt de la clarté de ce travail, nous ne parlerons pas des autres familles bactériennes.

3.2.1 β -lactamases-à-spectre-restréint (BLSR) ou Narrow-Spectrum- β -lactamases (NSBL)

En 1963, une souche d'*E. coli* productrice d'une BLA, appelée TEM, et porteuse du gène *bla_{TEM}* (numéroté -1 par la suite) a été isolée d'un patient (Temoneria, d'où TEM) à Athènes, et en 1965, il a été démontré que ce gène se trouvait sur un plasmide (Datta et Kontomichalou, 1965). Dans les années 70, une nouvelle BLA, SHV-1, encodée par le gène *bla_{SHV-1}* a été décrite chez *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ainsi que chez *E. coli*. Chez cette dernière, le gène *bla_{SHV-1}* est aussi localisé sur un plasmide et dérive d'un gène chromosomique (Rouvas et Pitton, 1974 ; Nugent et Hedges, 1979 ; Babini et Livermore, 2000). En 1976, 3 BLAs de type oxacillinases furent décrites : OXA-1, OXA-2 et OXA-3, encodées respectivement par les gènes *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-2}* et *bla_{OXA-3}* (Sykes et Matthew, 1976). Par la suite, le séquençage des gènes *bla_{OXA-1}* et *bla_{OXA-2}* a montré une homologie d'à peu près 48% seulement (Evans et Amyes, 2014). Cela est probablement la conséquence de la classification initiale des OXA, qui s'est basée sur un profil d'hydrolyse spécifique (incluant les oxacillines et leurs dérivés) présenté par quelques BLAs (Bradford, 2001). Le gène *bla_{OXA-2}* n'est donc probablement pas directement dérivé du gène *bla_{OXA-1}*, bien que ces deux gènes partagent un ancêtre commun, contrairement à ce qui sera observé pour les gènes *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}*.

De manière générale, ces premières BLAs possèdent un spectre relativement étroit envers les β -lactamines : elles hydrolysent toutes les pénicillines, y compris les semi-synthétiques sensibles aux BLAs, bien que seules les OXA hydrolysent les oxacillines, et peuvent également présenter une activité contre les C1G et C2G (Philippon *et al.*, 1998). Dans ce travail, elles seront reprises sous le terme de β -lactamases-à-spectre-restréint (BLSR), bien qu’elles se retrouvent aussi sous le terme de β -lactamases-à-large-spectre, ou *Broad-Spectrum- β -lactamases* (Bodendoerfer *et al.*, 2020).

3.2.2 β -lactamases-à-spectre-étendu (BLSE) ou *Extended-Spectrum- β -lactamases* (ESBL)

Des souches productrices de BLSE sont ensuite apparues, suite à l’accumulation de mutations dans les gènes codant initialement pour une BLSR, tel que pour le gène *bla_{SHV-2}* (Kliebe *et al.*, 1985). La première mention en Europe de souches productrices de BLSE avec résistance d’origine plasmidique a été faite en 1983 en Allemagne (Knothe *et al.*, 1983). Depuis lors, de nombreuses BLSE ont été découvertes, que ce soit par des mutations dans des gènes connus, codant initialement pour une BLSR, ou par l’apparition et la sélection de nouveaux gènes codant pour de nouvelles enzymes (CTX-M, GES, VEB, PER ...) (Bradford, 2001). Ainsi, les enzymes de type CTX-M (pour céfotaximases) ont été décrites pour la première fois en 1989 d’un isolat clinique d’*E. coli* (Bauernfeind *et al.*, 1990). Ces enzymes, codées par les gènes *bla_{CTX-M}*, sont actuellement les plus fréquentes des BLSE des entérobactéries humaines et animales (Argudin *et al.*, 2017).

À ce jour, il existe de nombreux variants de ces différents gènes, codant pour des enzymes ayant différents profils de résistance, toutes espèces bactériennes confondues : *bla_{TEM}* (240 +), *bla_{SHV}* (220+), *bla_{OXA}* (940+) et *bla_{CTX-M}* (240+) (Naas *et al.*, 2017).

Les BLSE ont un spectre étendu par rapport aux BLSR : elles hydrolysent également les C3G et C4G, mais restent généralement sensibles aux inhibiteurs des BLAs, tels les carbapénèmes (Courvalin *et al.*, 2010).

3.2.3 Céphalosporinases (AmpC)

La séquence du gène d’*E. coli* codant pour l’enzyme capable de détruire la pénicilline (Abraham et Chain, 1940) a été déterminée en 1981 et ce gène a été dénommé *bla_{ampC}*. Mais à l’heure actuelle la dénomination « AmpC » répertorie plusieurs enzymes (CMY, DHA, ...) n’ayant pas la même structure et codées par des gènes totalement différents (*bla_{CMY}*, *bla_{DHA}*, ...), qui sont également réparties dans des classes différentes de BLAs (*Cf. point 3.3. Classifications spécifiques des BLAs*) (Jacoby, 2009). Dans ce document, le terme « AmpC » est utilisé comme abréviation des céphalosporinases, comme retrouvé le plus souvent dans la littérature. Les AmpC ont une origine chromosomique ou plasmidique, selon le gène impliqué. Malgré le nom générique de céphalosporinases, leur spectre d’inactivation est plus étendu que celui des BLSE, puisqu’il inclut non seulement les pénicillines et les céphalosporines, mais aussi les inhibiteurs des BLAs. Parmi les β -lactamines, seul les carbapénèmes sont encore efficaces.

3.2.4 Carbapénémases (CP)

Des résistances via la production de BLAs sont également apparues pour ces antibiotiques. Ainsi, en 1996 aux États-Unis, la première CP a été décrite chez *K. pneumoniae*, d'où son nom de KPC-1, produite par un nouveau gène *bla* (*bla_{KPC-1}*), dans un isolat clinique provenant d'une étude épidémiologique sur la résistance aux antibiotiques (le projet ICARE : *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*) (Fridkin *et al.*, 1999 ; Yigit *et al.*, 2001). En 2001, la CP OXA-48, encodée par le gène *bla_{OXA-48}* dérivé des gènes *bla_{OXA}* d'origine, a été décrite pour la première fois dans un isolat de *K. pneumoniae*, provenant d'un homme de 54 ans présentant une infection urinaire et des brûlures cutanées, en Turquie (Poirel *et al.*, 2004). En 2005, la production de CP a également été décrite en France (Naas *et al.*, 2005). En 2009, une nouvelle CP a été découverte chez un patient suisse revenu d'Inde, l'enzyme New-Delhi-Métallo-β-lactamase de type 1 (NDM-1), encodée par le gène du même nom (*bla_{NDM-1}*) (Yong *et al.*, 2009). Un grand nombre d'autres CP existent à travers le monde, telles que les familles VIM et IMP.

Bien qu'elles soient rarement présentes chez les entérobactéries animales, des cas ont été répertoriés, notamment en Europe, avec la détection d'OXA-48 chez des animaux de compagnie (Pulss *et al.*, 2018 ; Melo *et al.*, 2017) mais aussi chez des animaux de production, avec la détection de NDM-4 chez une *E. coli* isolée d'un porc (Diaconu *et al.*, 2020), de VIM-1 chez des entérobactéries de porcs et de volailles (Fischer *et al.*, 2012 ; Fischer *et al.*, 2013) mais également dans de la viande de porc (Garcia-Graells *et al.*, 2020). La mention de VIM-1 a également été faite chez un veau en Inde (Murugan *et al.*, 2019).

3.3. Classifications spécifiques des β-lactamases

Vu le nombre très important d'enzymes BLAs et de leurs variants, leur classification est extrêmement complexe. Plusieurs classifications existent d'ailleurs, y compris celle décrite ci-dessus, dont les deux plus connues sont celles d'Ambler proposée en 1980 ou de Bush proposée en 1989. Ces classifications sont basées sur l'identification précise des BLAs et de leurs structures moléculaires ou de leurs caractéristiques fonctionnelles. Contrairement à la classification sur base des phénotypes de résistance décrite ci-dessus (BLSR, BLSE, AmpC et CP), elles ne sont pas aisément utilisables en routine diagnostique vétérinaire de par leur complexité.

3.3.1 Ambler

La classification d'Ambler (1980) est basée sur la structure moléculaire des BLAs et comporte 4 classes : A, B, C et D. Elle ne tient pas compte de la localisation chromosomique ou plasmidique du gène codant pour l'enzyme. Les enzymes des classes A, C et D possèdent une sérine au niveau de leur site actif, tandis que celles de la classe B ont 1 ou 2 ions Zn⁺⁺.

La classe A contient les BLAs qui restent habituellement sensibles aux inhibiteurs des BLAs, tandis que les 3 autres classes ne sont pas ou peu inhibées par ceux-ci. Certaines d'entre elles présentent un spectre

s'étendant aux C3G, voire aux carbapénèmes. Ainsi, s'y trouvent notamment les TEM, les SHV et les CTX-M et les KPC.

Les enzymes de la classe B sont toutes des métallo- β -lactamases (MBLs) qui peuvent être inhibées par les chélateurs d'ions, tels que l'EDTA (ÉthylèneDiamineTétraAcétique), via la perte du Zn⁺⁺. Ces BLAs hydrolysent toutes les β -lactamines, à l'exception des monobactames. De plus, elles résistent aux inhibiteurs des BLAs.

La classe C est également connue sous le nom de « Céphalosporinases », car les enzymes de cette classe confèrent une résistance aux C1G, ainsi qu'au C2G et C3G en cas de surexpression. La plupart du temps, ces BLAs sont codées par des gènes chromosomiques et inductibles, mais des exceptions existent.

La classe D contient des BLAs actives principalement sur l'oxacilline et la méticilline. Beaucoup de ces BLAs sont d'origine plasmidique, bien que ce critère ne soit pas pris en compte dans la catégorisation. Les BLAs majeures de cette classe sont les différents variants d'OXA, dont la CP OXA-48 (Frère, 2012).

3.3.2 Bush

La seconde classification, proposée par Bush en 1989, est basée sur les caractéristiques fonctionnelles des enzymes et comporte des groupes subdivisés en sous-groupes. En 1995, Bush et collaborateurs ont proposé une version adaptée de la classification initiale, suite aux nouvelles enzymes découvertes et à la re-caractérisation d'enzymes connues. Une nouvelle adaptation a eu lieu en 2010 afin de suivre l'évolution des découvertes des BLAs (Bush et Jacoby, 2010). Finalement, 3 groupes principaux sont décrits, associés à 16 sous-groupes. La comparaison avec les 4 classes d'Ambler est présentée dans le tableau II.

En résumé, le groupe 1 contient les AmpC, le groupe 2 est composé par les autres BLAs possédant une sérine au niveau de leur site actif. Ce groupe est divisé en nombreux sous-groupes en fonction du spectre d'activité des BLAs. Dans le groupe 3 se trouvent les MBLs, uniques en leur genre, puisqu'elles possèdent au moins un ion Zn⁺⁺ au niveau de leur site actif.

Tableau II : Classification des β -lactamases selon Bush et Jacoby (2010) et mise en relation avec la classification d'Ambler (1980)

Groupes (1)	Classes (2)	Substrat préférentiel	Inhibiteurs		Exemple de β -lactamases (3)
			Ac. Clav. ^a	EDTA ^b	
1	C	Céphalosporines	Non	Non	AmpC d' <i>E.coli</i> , CMY-2, P99, ACT-1, FOX-1, MIR-1
1e	C	Céphalosporines	Non	Non	GC1, CMY-37
2a	A	Pénicillines	Oui	Non	PC1
2b	A	Pénicillines, Céphalosporines (de première génération)	Oui	Non	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11
2be	A	Céphalosporines à spectre étendu, Monobactames	Oui	Non	TEM-3, SHV-2, CTX-M-1, Per-1, VEB-1
2br	A	Pénicillines	Non	Non	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Céphalosporines à spectre étendu, Monobactames	Non	Non	TEM-50
2c	A	Carbenicilline	Oui	Non	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilline, Céfèpime (C4G)	Oui	Non	RTG-4
2d	D	Cloxacilline	Variable	Non	OXA-1, OXA-10
2de	D	Céphalosporines à spectre étendu	Variable	Non	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapénèmes	Variable	Non	OXA-23, OXA-48
2e	A	Céphalosporines à spectre étendu	Oui	Non	CepA
2f	A	Carbapénèmes	Oui	Non	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapénèmes	Non	Oui	IMP (1 à 26), VIM (1 à 23), CcrA, IND-1
	B (B3)				L-1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapénèmes	Non	Oui	CphA, Sfh-1

(1) Classification selon Bush et Jacoby (2010) ; (2) Classification selon Ambler (1980) ; (3) D'après Bush et Jacoby (2010) ; (a) Acide clavulanique ; (b) ÉthylèneDiamineTétraAcétique.

4. Méthodes de détection des résistances

Les β -lactamines étant une classe d'antibiotiques largement utilisée, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, il n'est pas étonnant d'observer de nombreuses résistances, dont certaines représentent de réels problèmes de santé publique. La détection de ces bactéries résistantes est donc indispensable, tant dans le choix du traitement à mettre en place, que dans un but de suivi et de caractérisation de ces résistances (OIE, 2015).

Plusieurs méthodes, phénotypiques et génétiques, existent, chacune ayant ses avantages et inconvénients. Les tests phénotypiques montrent le type de résistance exprimé par la bactérie, tandis que les tests génétiques permettent de mettre en évidence le(s) gène(s) de résistance présent(s), mais pas nécessairement exprimé(s). Bien entendu, un même phénotype de résistance aux β -lactamines peut être encodé par différents gènes *bla*, voire par divers mécanismes de résistance, et seules les méthodes génétiques permettent de les différencier. De plus, les tests utilisés doivent répondre à des normes, suivies lors de la réalisation du test, permettant la comparaison des résultats entre laboratoires.

4.1 Phénotypiques

Les tests phénotypiques permettent, en 3 étapes, de catégoriser cliniquement les bactéries testées pour une série d'antibiotiques dans l'une des 3 classes suivantes : sensible (S), sensible à haute dose (I) autrefois appelée « intermédiaire », ou résistante (R).

La première étape consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la bactérie par rapport aux antibiotiques testés. Cette CMI est la plus petite concentration en antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne. La deuxième étape compare la CMI aux valeurs critiques permettant de déterminer les catégories S, I et R. Pour la troisième étape, une lecture interprétative validera les résultats obtenus, pouvant aussi mener à un changement de catégorie (de S à I ou R) (Quentin-Noury, 2016).

Il existe deux types de valeurs critiques auxquelles la CMI peut être comparée : les valeurs seuils cliniques (VC), aussi connues sous le terme *clinical breakpoints*, axées sur le patient infecté par la bactérie, ou les valeurs seuils microbiologiques, axées sur l'espèce bactérienne, aussi connues sous le terme d'*epidemiological cut-off value (ECOFF)*, permettant une approche épidémiologique des résistances.

Les VC, utilisées lors d'un diagnostic de laboratoire, tiennent compte de nombreux paramètres tels que l'espèce (humain, bovin, caprin, ...) de laquelle a été isolée la bactérie ou encore la cinétique de l'antibiotique pour l'espèce déterminée. Elles permettent de déterminer une probabilité de succès thérapeutique du patient et sont donc une aide pour le médecin ou le vétérinaire. Ainsi, une bactérie sensible à un antibiotique donné présente une grande probabilité de succès thérapeutique avec cet antibiotique, contrairement à une bactérie résistante. L'ECOFF quant à elle, ne tient compte que de l'espèce bactérienne considérée et de sa résistance ou non à un antibiotique donné par rapport à la

population sauvage (définie comme non résistante). Elle regroupe les données de très nombreux antibiogrammes. Cette valeur peut être utilisée dans le cadre d'une approche épidémiologique pour détecter les résistances émergentes. En règle générale, la VC sera supérieure à l'ECOFF (la CMI correspondante à la VC sera plus élevée que celle de l'ECOFF), puisqu'il n'y a pas lieu de séparer les bactéries sauvages (donc sensibles) en catégories S et R (Giguère *et al.*, 2013).

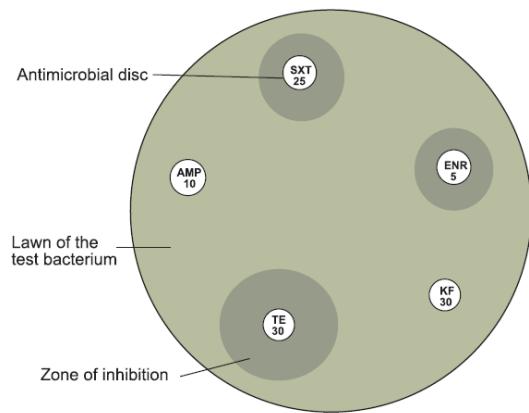
Les laboratoires ont recours aux méthodes suivantes (Figure 7) : la diffusion en gélose à partir de disques imprégnés de l'antibiotique ou antibiogramme, de loin la plus répandue, et les dilutions en bouillon de l'antibiotique, peu répandues dans le cadre vétérinaire, contrairement au diagnostic en médecine humaine. Les bandelettes (comme l'Etest® de BioMérieux) comportant un gradient de concentrations d'un antibiotique donné sont rarement utilisées en routine diagnostique vétérinaire, car trop coûteuses.

Ces différents tests phénotypiques sont standardisés au niveau des laboratoires, afin de permettre la comparaison des résultats. Ainsi, pour les antibiogrammes réalisés par la méthode de diffusion des disques sur gélose, l'isolat d'*E. coli* est ensemencé en tapis sur une gélose de Mueller-Hinton et les disques d'antibiotiques sont déposés sur cette gélose endéans les 15 minutes, sans dépasser 1h, suivant l'ensemencement. Après une incubation à 35 +/- 2°C pendant 16h à 24h, les diamètres d'inhibition de la croissance bactérienne sont mesurés et comparés à des référentiels européens (Société Française de Microbiologie, 2021 et 2020), déterminés par l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) et le *Veterinary Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (VetCAST) ou américains, déterminés par le CLSI pour *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Une contradiction entre les observations des tests *in vitro* et le traitement réalisé *in vivo* peut parfois être observée. En effet, de nombreux facteurs entrent en compte *in vivo* alors qu'ils ne sont pas présents lors des tests *in vitro*. Pour qu'un antimicrobien soit efficace sur le plan clinique, il doit atteindre une concentration suffisamment élevée au site d'infection pour inhiber la croissance ou tuer l'organisme. Les seuils de résistance sont donc liés aux concentrations pouvant être atteintes dans les tissus cibles. Ces concentrations varient selon les différents sites corporels ou liquides et des études pharmacocinétiques sont donc nécessaires pour déterminer si les concentrations thérapeutiques sont atteintes dans les tissus cibles. Les seuils de résistance sont également spécifiques à l'espèce animale, au schéma posologique (dose, voie d'administration et fréquence), à la maladie et à l'agent pathogène cible. Lorsque l'un de ces facteurs est modifié (par exemple, un médicament administré par voie orale au lieu d'être injecté), la valeur prédictive des seuils de résistance pour les résultats cliniques peut ne plus être valable (Giguère *et al.*, 2013).

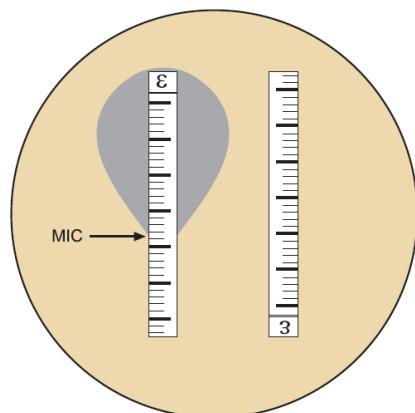
Figure 7 : Méthodes phénotypiques de détections des résistances par antibiogramme avec diffusions de disques en milieu gélosé, e-test et dilutions en milieux liquides

7a



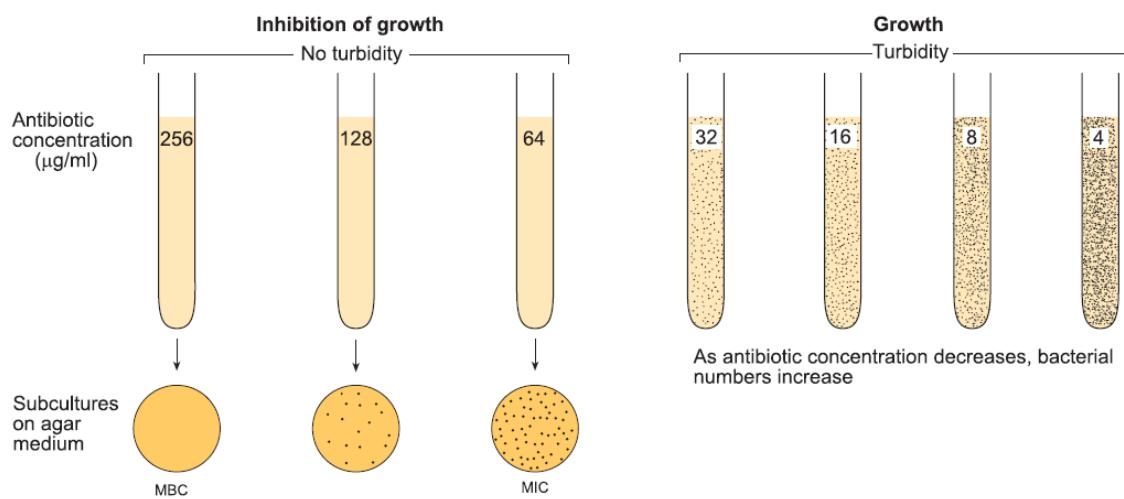
Antibiogramme par diffusion de disques sur milieu gélosé. La gélose est ensemencée avec un tapis bactérien et les disques contenant une concentration définie d'antibiotique (notée sur le disque, en μg) y sont déposés. Après une incubation de 18h à 37°C, les diamètres d'inhibitions sont lus. La zone d'inhibition est la zone entourant un disque où aucune poussée bactérienne n'est observée. Antibiotiques : AMP, ampicilline ; SXT, triméthoprime-sulfaméthoxazole ; ENR, enrofloxacine ; Kf, céphalotine ; TE, tetracycline.

7b



Bandelettes de plastique inerte contenant un gradient prédéterminé d'un antibiotique. Ces bandelettes sont placées sur un milieu ensemencé avec un tapis bactérien et après une incubation de 18h à 37°C, la valeur de la concentration minimale inhibitrice (flèche noire) est lue sur l'échelle de la bandelette.

7c



Dilutions successives d'un antibiotique en milieux liquides, ensemencées avec la bactérie à tester. MBC : concentration bactéricide minimale (aucune bactérie ne pousse). MIC : concentration minimale inhibitrice (croissance bactérienne inhibée, pas de pousse visible à l'œil nu)

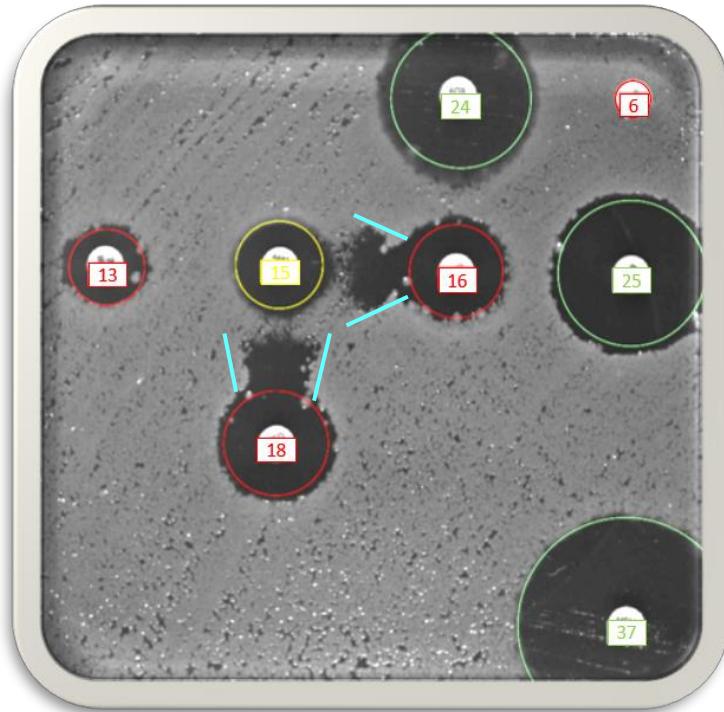
Source : Quinn *et al.*, 2016. Pages 20 et 21.

4.1.1 Diffusion de disques sur gélose ou *Disk-Diffusion-Assay (DDA)*

La diffusion en gélose repose sur la mesure du diamètre de la zone d'inhibition entourant des disques d'antibiotiques placés sur une gélose ensemencée avec la bactérie à tester (Figure 7a). Le diamètre d'inhibition est inversement proportionnel à la CMI. Cette méthode présente l'avantage d'être simple, peu coûteuse, standardisée et automatisée (tout ou en partie), ainsi que de permettre le test d'un grand nombre d'antibiotiques (jusqu'à 16 disques par boîtes). De plus, la détection d'une contamination par un autre germe ou l'observation d'interactions spécifiques entre antibiotiques est possible.

Par exemple, l'antibiogramme d'une souche productrice de BLSE montre une synergie en bouchon de champagne entre une C3G/C4G et l'inhibiteur des BLAs (Figure 8). D'un point de vue clinique, l'inconvénient principal est le délai important (plus de 48h depuis le prélèvement chez le patient) avant l'obtention des résultats, mais l'automatisation partielle ou complète des différentes étapes le réduit. Il faut cependant compter un minimum de 18h d'incubation avant l'obtention de résultats et, comme pour les autres tests phénotypiques, des faux négatifs sont possibles lors d'une expression minimale ou inexiste *in vitro* des gènes de résistance. Ainsi, une bactérie pourrait avoir un résultat « S » *in vitro* alors qu'elle est en réalité « R » *in vivo* (Osei Sekyere *et al.*, 2015).

Figure 8 : Synergie entre les céphalosporines et l'inhibiteur des β -lactamases observée lors de la détection d'une bactérie productrice de β -lactamases-à-spectre-étendu



Vert : sensible. Jaune : intermédiaire. Rouge : résistant. La synergie spécifique aux β -lactamases-à-spectre-étendu en bouchon de champagne (lignes bleues) entre deux des céphalosporines testées et l'inhibiteur des β -lactamases.

Le diamètre d'inhibition est exprimé en mm pour chaque antibiotique dans les rectangles au centre des cercles. Céfoxidine : 24 ; Amoxicilline : 6 ; Ceftiofur : 13 ; amoxicilline + acide clavulanique : 15 ; Céfotaxime : 16 ; Céfotaxime + acide clavulanique : 25 ; Cefquinome : 18 ; Méropénème : 37.

Source : travail personnel

4.1.2 Dilutions en bouillon

La dilution en bouillon consiste à ensemencer plusieurs tubes de bouillon de croissance contenant des concentrations différentes d'un même antibiotique (dilutions en série). La CMI est déterminée après une incubation de 16 à 18 heures (Figure 7c) (Willey *et al.*, 2017). Des systèmes automatisés ou semi-automatisés utilisant des microdilutions en plaque existent également pour cette méthode (Quentin-Noury, 2016). L'avantage de cette recherche directe de la CMI, outre l'automatisation, est la possibilité d'une détection précoce de la résistance, ce qui n'est pas possible avec la méthode précédente (*Cf.* point 4.1.1). Cependant le coût de cette méthode est supérieur, la rendant peu utilisée en diagnostic vétérinaire.

4.1.3 Bandelettes (Etest®)

Comme pour la diffusion des disques sur gélose, des bandelettes imprégnées d'un gradient de concentration de l'antibiotique à tester sont déposées sur une gélose, ensemencée avec la bactérie à étudier, dans laquelle l'antibiotique diffuse. Après une incubation de 18 à 24 heures, la CMI est lue directement, à l'endroit où la culture bactérienne rencontre la bandelette (Figure 7b) (Willey *et al.*, 2017).

4.2 Génétiques

Comme leur nom l'indique, les tests génétiques se basent sur le support génétique, l'ADN, pour y détecter les gènes de résistances. Cet ADN étant enfermé dans la bactérie, la première étape, indispensable avant toute analyse, est de l'extraire. Pour cela, plusieurs méthodes existent et dépendent des tests envisagés. En effet, plus l'ADN sera pur, plus la qualité des résultats obtenus sera élevée.

4.2.1 Méthodes d'extraction de l'ADN bactérien

La première chose à faire dans toute extraction d'ADN est de lyser les bactéries, à partir d'une culture pure des bactéries à étudier. Cela peut se faire thermiquement, soniquement ou chimiquement. La lyse thermique est la plus simple à mettre en œuvre, car elle consiste à chauffer une solution contenant les bactéries à 100 °C pendant un temps propre à chaque espèce. L'inconvénient de cette méthode est que l'ADN se retrouve mélangé à de nombreux débris cellulaires, qui peuvent interagir lors de certaines analyses, comme le séquençage. La lyse par sonication consiste à lyser les bactéries par l'utilisation de vibrations très rapides (des ultrasons), en cycles successifs très courts (Joshi et Jain, 2017). Quant à la lyse chimique, elle consiste à utiliser des produits chimiques combinés à une enzyme, pour dégrader la membrane bactérienne. Différentes étapes successives permettent ensuite de purifier l'ADN. La lyse chimique bénéficie de la commercialisation de kits d'extraction, incluant la purification de l'ADN.

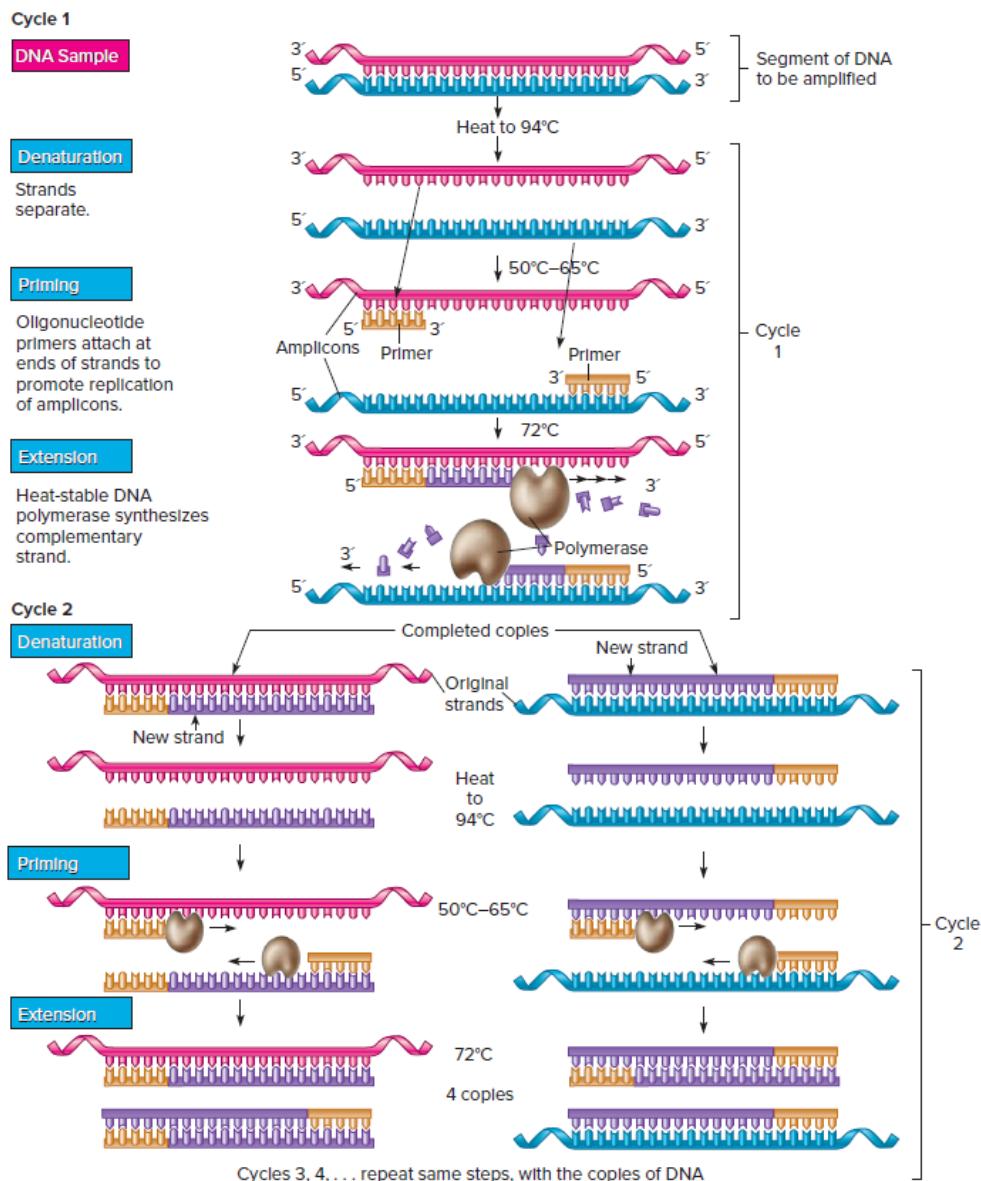
4.2.2 Réaction en chaîne par polymérase ou *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

La PCR consiste à multiplier un fragment d'ADN par en moyenne 30 à 40 cycles successifs de réPLICATION (Figure 9), qui permettent une amplification exponentielle de la quantité d'ADN ciblé par les amorces. Ensuite, le produit de PCR est placé avec un révélateur (Midori green, bromure d'éthidium) dans un gel d'agarose pour une électrophorèse, et la révélation se fait par une lumière ultraviolette, mettant en évidence une bande correspondante au fragment d'ADN amplifié (Markey *et al.*, 2013). Ce type d'analyse permet de détecter un ou plusieurs gènes, mais la plupart du temps seulement au niveau générique. Elle peut difficilement mettre en évidence la multitude de variants existants de gènes *bla* d'une même famille (Lupo *et al.*, 2013 ; Ongutu *et al.*, 2015). Cependant, elle permet de différencier certains sous-groupes, notamment dans les gènes *bla_{CTX-M}* (Roschanski *et al.*, 2014).

Pour détecter des variants d'un même gène amplifié par PCR, deux analyses peuvent être réalisées sur le produit de PCR. La première est d'utiliser des enzymes de restrictions qui permettent de diviser le

gène à des endroits précis, donnant différentes tailles de fragment en fonction du variant. Ainsi, pour les gènes *bla_{TEM}*, Arlet et collaborateurs (1995) ont utilisé des endonucléases qui leurs ont permis de différencier certains variants. La seconde méthode est de séquencer le produit de PCR pour identifier précisément le(s) variant(s) du(des) gène(s) présent(s) comme l'ont fait Naas et collaborateurs (2007) pour différencier 5 groupes de gènes *bla_{CTX-M}* initialement identifiés par une PCR quantitative.

Figure 9 : Étapes de la réaction en chaîne par polymérase (PCR, *polymerase chain reaction*)



Multiplication d'un fragment d'ADN par la réaction en chaîne par polymérase. Dénaturation : séparation des deux brins complémentaires d'ADN par la chaleur. Hybridation des amores (priming) : liaison des amores spécifiques d'un gène cible sur les brins d'ADN. Extension : amplification de la région cible située entre les amores, via une ADN polymérase stable à la chaleur.

Source : Talaro et Chess 2018. Page 307.

4.2.3 Séquençage complet du génome ou Whole Genome Sequencing (WGS)

Le séquençage complet du génome (chromosome et plasmides) permet d'obtenir un grand nombre d'informations, comme l'identification de la bactérie, son typage, la détection de gènes de résistance, en un seul test, mais coûte encore cher (Quainoo *et al.*, 2017). Cependant, un gain de temps au niveau de l'analyse et de la prise en charge des patients se traduit aussi par une économie, comme l'ont démontré Mellmann et collaborateurs (2016), où une analyse complète et précise par WGS a réduit le nombre de patients présents en isolement sur une période de 6 mois et a permis d'économiser plus de 200.000€. Il est probable que cette technique se démocratise dans les années à venir, notamment par le plus grand nombre de laboratoires y ayant recours et une éventuelle diminution des coûts.

Il existe de nombreuses méthodes de séquençage selon le matériel à séquencer. Nous n'aborderons ici que les principes de bases liés au séquençage complet du génome. Le principe général est le suivant : la formation des librairies correspondant à la préparation de fragments d'ADN qui seront amplifiés sur un support, suivie du séquençage à proprement parler et de l'analyse informatique (Figure 10).

La formation des librairies consiste principalement en une fragmentation aléatoire du génome, avec l'addition d'adaptateurs spécifiques permettant l'amplification, le séquençage et l'indexage, ainsi que des étapes de purification pour conserver les fragments d'une même taille moyenne, définie par le type de séquençage choisi. Le marquage de chaque fragment d'ADN avec un index permet d'identifier chaque échantillon. L'ajout des adaptateurs P5 et P7 permettra la liaison sur le support de séquençage. En effet, lors du séquençage, les extrémités P5 vont se lier à leur séquence complémentaire située sur le support de séquençage (la *flow cell*). Une étape d'amplification de ces brins est réalisée, ce qui permet de créer des groupes de brins identiques. Ensuite, le séquençage a lieu, par l'incorporation de bases marquées fluorescentes. Cette fluorescence est captée par le séquenceur et les images seront transformées en séquences génétiques par un processus informatique. Finalement, les différentes séquences réalisées sur le même support seront triées par le démultiplexage.

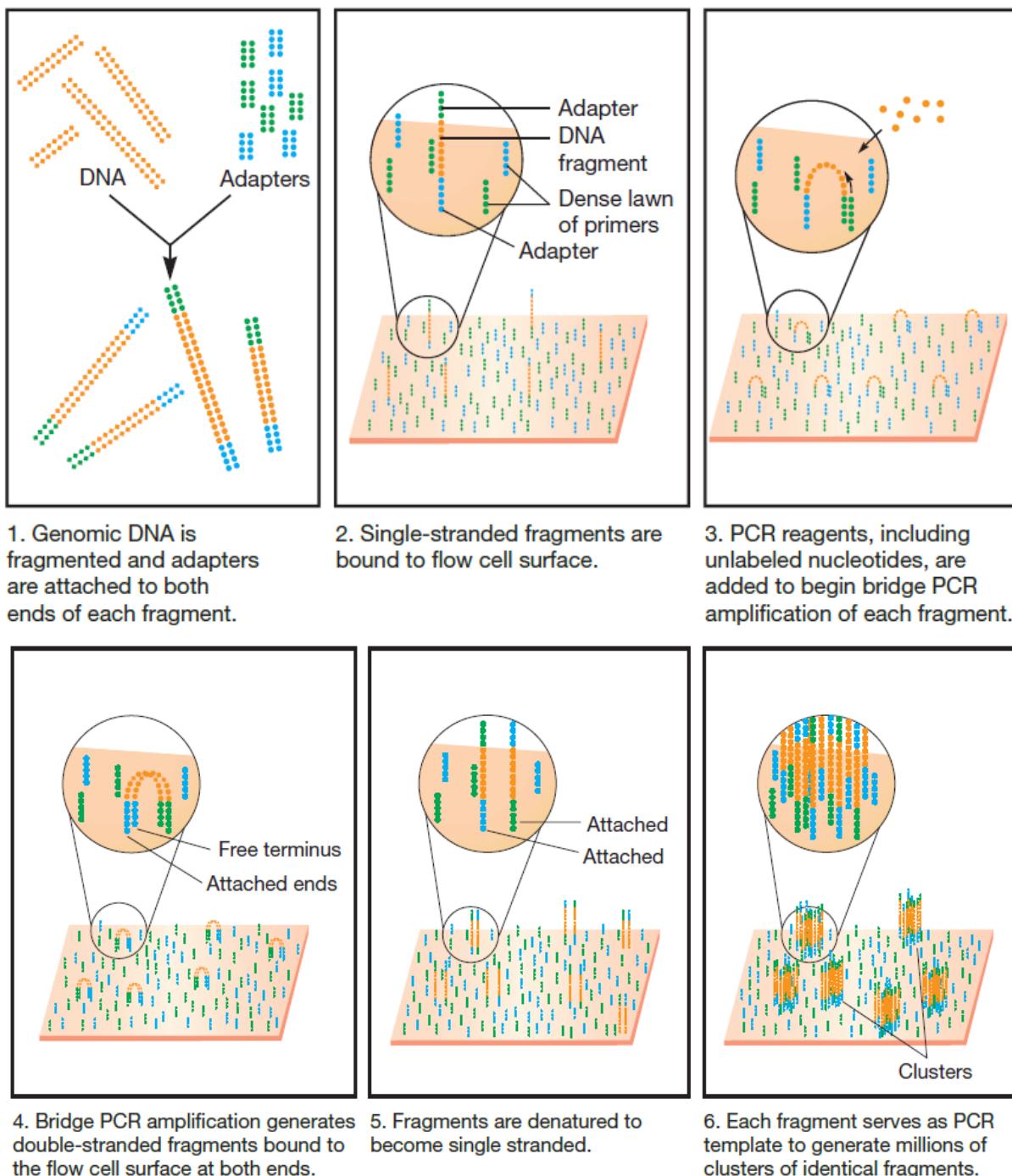
Viennent ensuite les étapes informatiques avec l'assemblage, nécessaires avec le séquençage de type *short-reads*. En effet, ce type de séquençage donne une multitude de séquences assez courtes, les *reads*, qui sont ensuite assemblées par l'identification de mots (*k-mers*) partagés entre certains *reads*, en séquences plus longues et continues, les *contigs*, qui représentent des parties du génome. Ce type de séquençage a une profondeur de couverture importante, due au grand nombre de *reads* obtenus, mais l'étendue de sa couverture n'est pas toujours complète. En effet, des « trous » entre les *contigs* obtenus sont possibles, essentiellement dues à des séquences répétées, mais aussi lorsqu'une séquence est manquante, ce qui donne un génome incomplet. En revanche, cela permet une détection assez précise des mutations puisque la profondeur est importante (Quainoo *et al.*, 2017). Cette technique est très puissante pour détecter les gènes de résistance connus et des dérivés proches. Par contre, il est plus

difficile de discriminer les localisations chromosomiques et plasmidiques, car la reconstruction des plasmides n'est pas toujours complète.

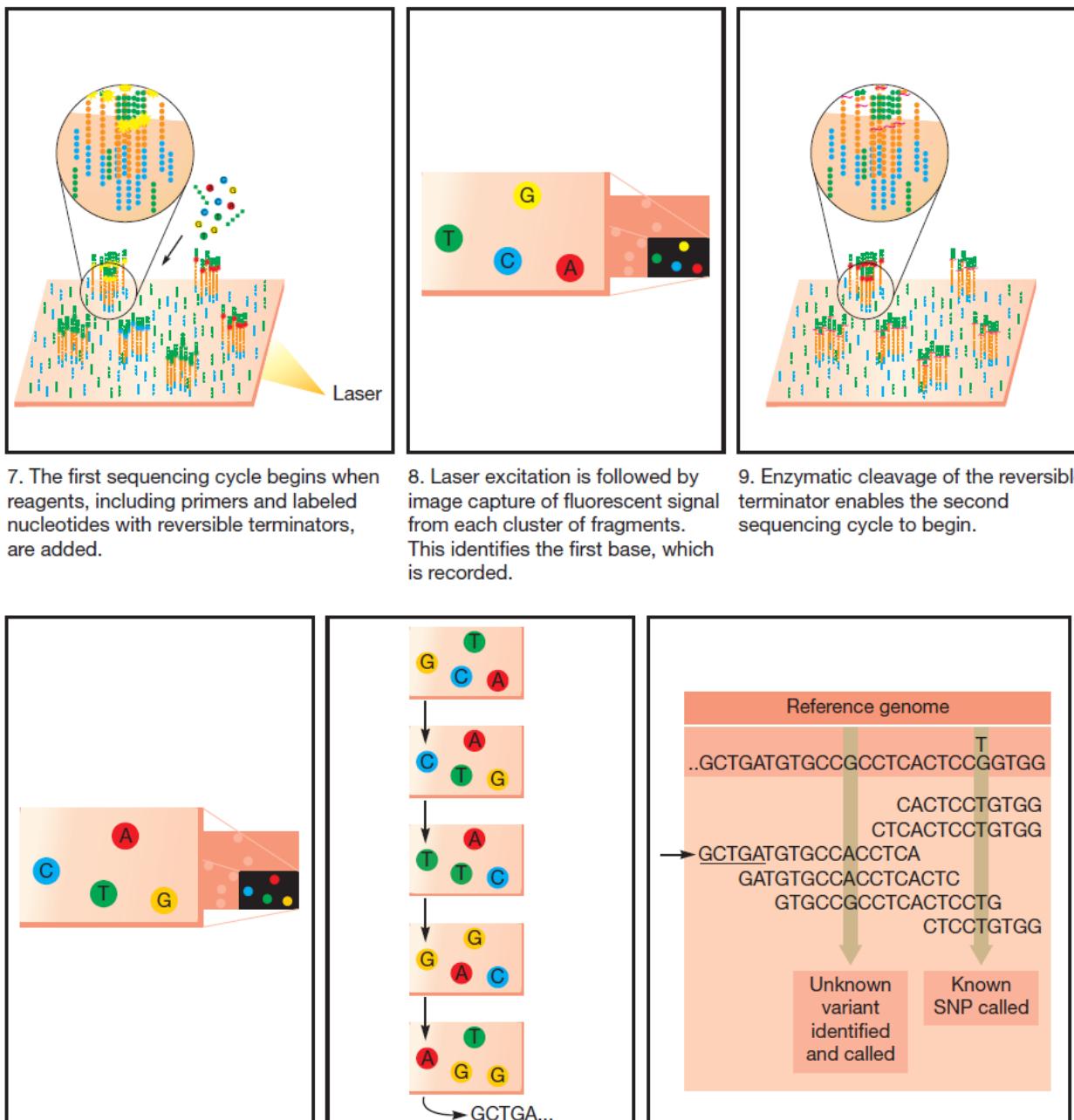
Finalement, les séquences sont analysées via les différents outils informatiques disponibles (Willey *et al.*, 2017). Ceux-ci sont utilisables en ligne ou téléchargeables pour un usage local, mais n'ont pas toujours les mêmes performances.

Deux types de WGS sont à distinguer : les plateformes de seconde génération qui permettent de séquencer un génome bactérien entier en quelques heures, en générant de nombreuses séquences assez courtes (*short-reads*), représentés par « Illumina », tandis que les plateformes de troisième génération génèrent de longues séquences (*long-reads*) et peuvent apporter des informations supplémentaires et obtenir une séquence complète du chromosome et des plasmides d'une bactérie (Quainoo *et al.*, 2017). Ces dernières ne seront pas abordées plus en détail dans ce travail pour une question de clarté. L'idéal est de combiner les deux, puisque cela permet d'avoir l'entièreté du génome, plasmides inclus, sans erreur.

Figure 10 : Méthode de fonctionnement d'une analyse par séquençage complet du génome



1. Préparation des ADN, formation des librairies, spécifiques au séquençage programmé. Ajout d'adaptateurs P5 et P7 et si nécessaire, d'un index pour identification du génome.
- 2 à 6. Liaison des fragments d'ADN via les adaptateurs sur le support (la *flow cell*) puis réactions en chaîne par polymérase pour obtenir des groupes de fragments identiques (*clusters*).



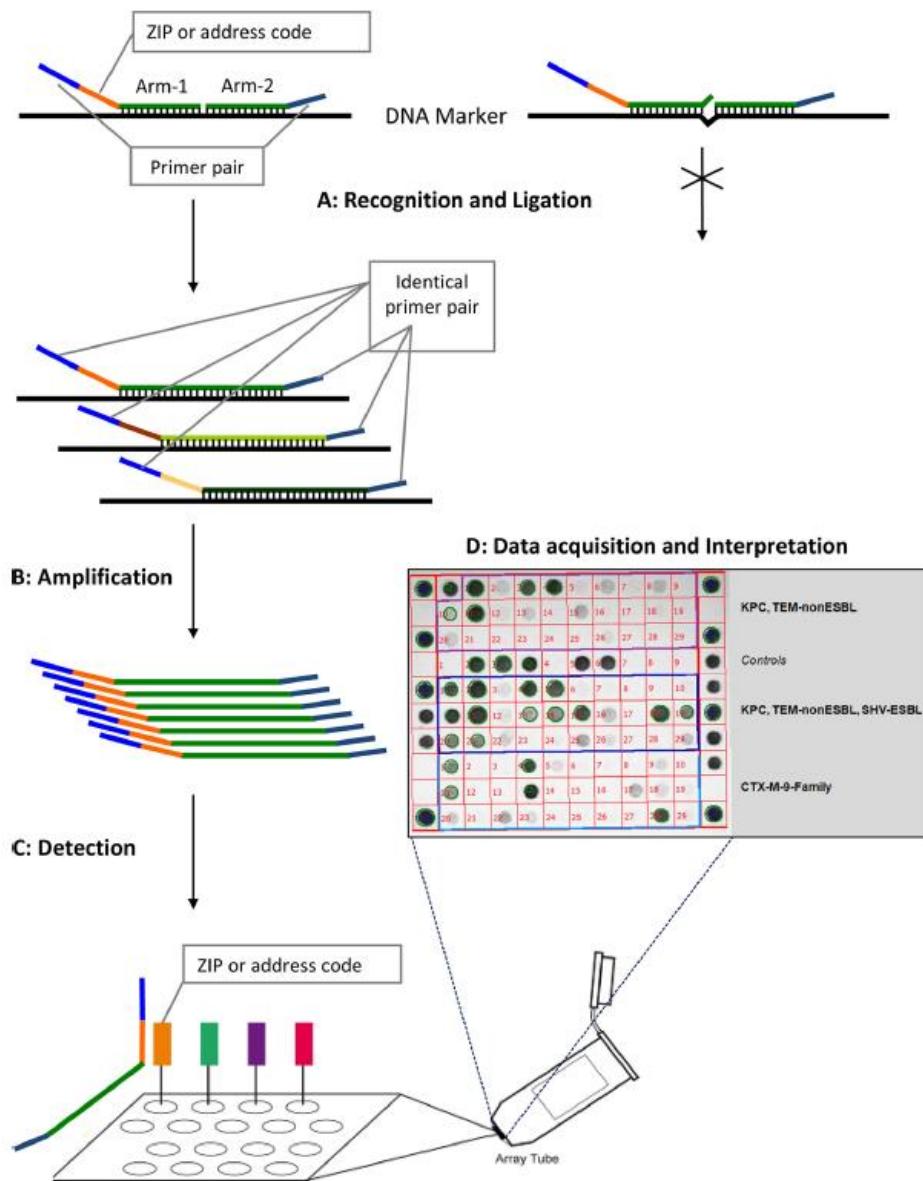
7 à 11. Séquençage par introduction des bases marquées une par une, suivie d'une excitation par un laser et la capture de l'image. Cette étape est répétée jusqu'à ce que toutes les bases de chaque *clusters* soient ajoutées. 12. Les séquences obtenues après le démultiplexage des images et l'assemblage des *reads* sont alignées et comparées à un génome de référence, ce qui permet de détecter notamment les mutations d'une seule base, les SNP, *single nucleotide polymorphism*.

Source : Willey *et al.*, 2017. Pages 422 et 423.

4.2.4 Micro-puces à ADN ou *microarrays* (MA)

La technique génétique par micro-puces à ADN (MA pour *microarrays*), est décrite comme une alternative à la PCR et au WGS, bien que cette technique soit aussi chère et demande du temps (Cunningham *et al.*, 2016). Les MA peuvent se réaliser en phase solide, qui consiste à avoir des sondes d'acides nucléiques fixées sur une lame, un tube ou une barrette, qui se lieront à leur séquence complémentaire. Les MA peuvent aussi se réaliser en phase liquide, où les sondes sont liées à des microbilles, mais le principe reste le même. Cette technique permet de cibler un grand nombre de gènes différents en une seule série de réactions de PCR, via l'utilisation d'amorces universelles fixées à des sondes spécifiques pour chaque gène, chacune étant marquée par un code-barres afin de permettre l'identification finale des gènes ciblés présents dans l'échantillon (Figure 11 ; Endimiani *et al.*, 2010).

L'intérêt majeur de cette technique est sa capacité à détecter des mutations d'une seule base, les SNPs (pour *Single Nucleotide Polymorphism*). Cela se fait lors de la première étape pendant la liaison des sondes. Lorsqu'un SNP est présent, les brins de la sonde ne se lient pas correctement sur le gène, ils ne sont alors pas reliés par la ligase, qui assemble normalement les deux parties de la sonde en un brin unique lorsqu'ils sont correctement positionnés. La présence d'un SNP entraîne donc « l'annulation » de l'étape d'amplification et de la suite, ce qui fait qu'aucun variant différent de ceux ciblés par le test ne pourra être détecté (Endimiani *et al.*, 2010).

Figure 11 : Principe de fonctionnement des *microarrays*, d'après Endimiani et collaborateurs (2010)

Les différentes étapes de la détection de gènes spécifiques. Étape A : reconnaissance et liaison avec le brin d'ADN cible. Lorsque tous les nucléotides sont correctement alignés, une ligase lie les deux brins (*arm-1* et *arm-2*) de la sonde et permet l'étape B. Si la ligase ne peut agir, les étapes suivantes n'ont pas lieu. Cela permet de détecter les *singles nucleotides polymorphismes* (SNPs). Étape B : amplification par PCR des gènes ciblés. L'utilisation d'amorces (*primer*) universelles sur les différentes sondes permet d'amplifier tous les gènes ciblés et leurs codes uniques (*zip code*) en une seule réaction. Étape C : détection. Chaque code unique lié à son gène cible s'hybride avec la cible correspondante sur la grille des *microarrays*. Étape D : acquisition des données et interprétation par le logiciel. Un logiciel associé au lecteur spécifique pour les tubes acquiert et interprète les images obtenues.

Source : Endimiani *et al.*, 2010.

5. Suivi et situation des résistances aux β -lactamines

5.1 Les résistances, un problème mondial

En médecine, tant humaine que vétérinaire, l'utilisation d'agents antimicrobiens, y compris les antibiotiques, crée une pression sélective favorisant la sélection de résistances chez divers micro-organismes (bactéries, parasites et virus). Suite à la libre circulation des personnes et des biens entre les pays, ainsi qu'au transport international du bétail, le problème des résistances aux antimicrobiens (AMR pour *Antimicrobial Resistance*) est devenu mondial (Argudin *et al.*, 2017). Ces résistances présentes à l'échelle planétaire sont un problème d'envergure, comme mis en évidence en 2016 dans *The review on Antimicrobial Resistance*, car au minimum 700 000 personnes meurent chaque année suite à des infections causées par des organismes (multi-)résistants. Si aucune mesure n'est prise d'ici 2050, une estimation prévoit jusqu'à 10 millions de morts par an (O'Neill, 2016). Bien que ces prédictions ne tiennent pas compte de paramètres tels que l'amélioration de la surveillance et de l'hygiène et le succès de nouvelles thérapies, il est impossible de nier l'importance du problème (Robinson *et al.*, 2016). Rien qu'en Europe, les infections par des bactéries multi-résistantes causent la mort de 33 000 patients chaque année (ECDC, 2019). L'AMR est la problématique qui incarne au mieux les principes du concept de *One Health* (Robinson *et al.*, 2016). En effet, celui-ci peut être défini comme étant « une stratégie mondiale visant à développer les collaborations et communications interdisciplinaires dans tous les aspects des soins de santé pour les personnes, les animaux et l'environnement » (*One Health initiative*) (Figure 12). Les bactéries résistantes, commensales ou pathogènes, qu'elles soient d'origine humaine, animale ou environnementale, peuvent, en effet, se propager ou transmettre leurs gènes de résistance entre humains et animaux par différentes voies (Figure 13), telles que la nourriture, les contacts directs homme-animal ou l'environnement (Da Costa *et al.*, 2013). Les antibiotiques gardent malgré tout un rôle clé dans le traitement d'infections bactériennes, tant en médecine humaine que vétérinaire et le problème des résistances concerne dès lors un large public. C'est pourquoi depuis 2010, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et pour l'agriculture (FAO) se sont associées pour prendre des mesures afin de lutter contre ces résistances (OMS, OIE et FAO, 2010). Cela explique que certains antibiotiques, notamment les C3G et C4G, ont été classés en tant qu'antibiotiques « critiques », dont l'usage en médecine des animaux de production est restreint et réglementé dans de nombreux pays, mais pas encore en médecine des animaux de compagnie (Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 en France, Arrêté Royal du 21 juillet 2016 en Belgique). Ces législations suivent les recommandations émises, depuis 1997, par l'OMS sur l'usage des antibiotiques chez les animaux producteurs de denrées alimentaires (OMS, 2017). Ainsi, en Belgique, l'utilisation de ces antibiotiques ne peut se faire qu'après un test de sensibilité ayant mis en évidence l'efficacité de ce seul antibiotique sur la bactérie responsable de l'infection et l'absence d'efficacité d'autres antibiotiques (Arrêté Royal du 21 juillet 2016).

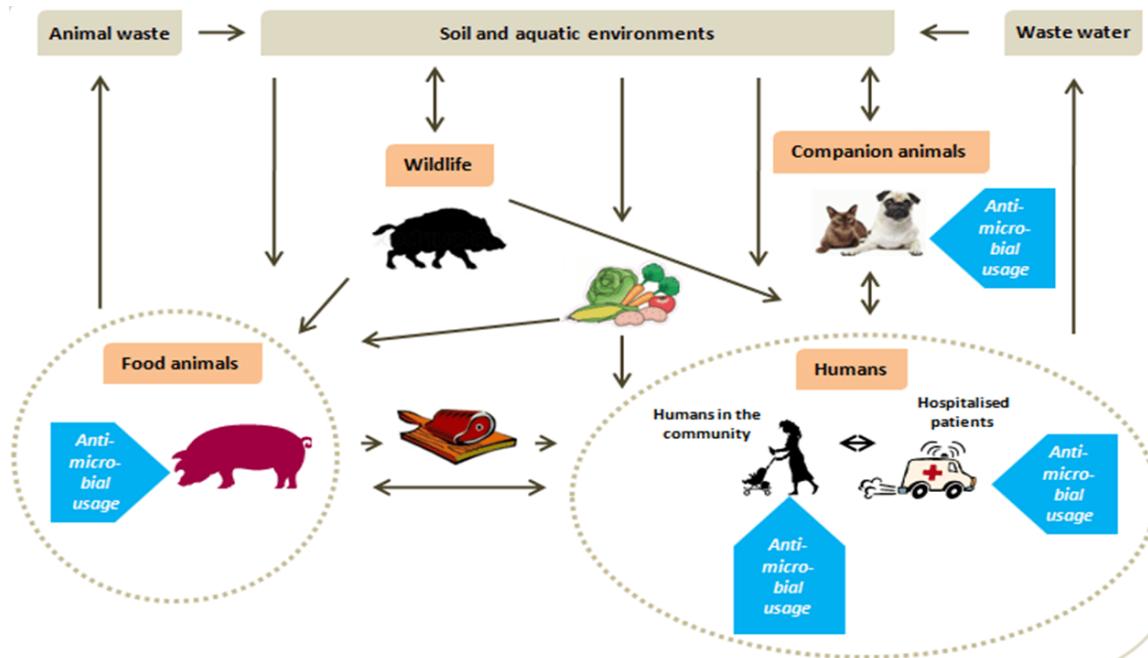
Figure 12 : Schématisation du concept du *One Health*, avec la triade impliquée



La santé des êtres humains, des animaux et de l'environnement est pleinement liée.

Source de l'image : <http://www.onehealthinitiative.com/news.php>

Figure 13 : Voies d'échange des bactéries et des gènes de résistance aux antimicrobiens entre les différents réservoirs



Les flèches noires représentent les voies de transfert possibles, tandis que les différents réservoirs sont indiqués dans les rectangles orange/brun. Les cibles de l'utilisation d'antibiotiques sont indiquées par les flèches bleues.

Source : <https://www.amcra.be/fr/antibiotiques-et-antibioresistance/>

5.2 Qu'en est-il chez nous ? Focus sur l'Europe et la Belgique

Au niveau européen, le système de surveillance des résistances aux antimicrobiens (EARS-Net pour *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) collecte et analyse les données sur la résistance aux antibiotiques dans les états membres. Ces données concernent l'antibiorésistance d'un point de vue humain et sont pondérées par la population de chaque pays. Les points à retenir du rapport 2020, présentant les chiffres de 2019 sont les suivants :

- 57,1% des *E. coli* isolées d'hémoculture étaient résistantes à au moins un des groupes antimicrobiens sous surveillance régulière (aminopénicillines, fluoroquinolones, C3G, aminoglycosides et carbapénèmes) ;
- le pourcentage moyen le plus élevé de résistance concerne les aminopénicillines (57,1%), suivies des fluoroquinolones (23,8%), des C3G (15,1%) et des aminoglycosides (10,8%) ;
- la résistance aux carbapénèmes reste faible (0,3%).

Bien que ces valeurs ne semblent pas forcément alarmantes, elles sont supérieures à celles du rapport de 2016. Les résistances continuent donc de progresser, bien que cette augmentation soit moins marquée que celle observée en 2012 par rapport à 2008. De plus, des inégalités sont observées selon les pays, avec une variation nord-sud (Figure 14). En effet, les résistances aux C3G sont plus souvent détectées au niveau des états membres du sud que dans ceux du nord (ECDC, 2020b et 2017).

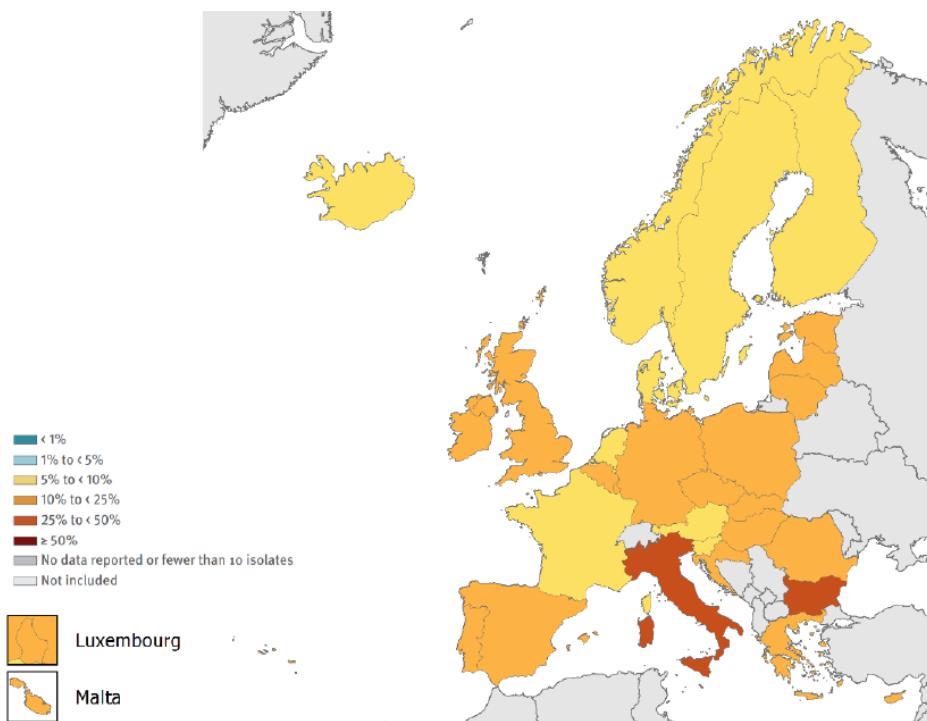
Dans son rapport de 2020, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, pour *European Food Safety Authority*) présente une situation similaire à celle observée chez l'être humain pour les animaux d'élevage (volailles, porcs et bovins) sur la période 2017-2018. Les résultats présentés dans ce rapport concernent les analyses d'*E. coli* indicatrices, prélevées en abattoir. Le taux de résistance le plus élevé concerne les aminopénicillines, tandis qu'aucune résistance aux carbapénèmes n'a été rapportée. Les résistances aux C3G sont rares ou avec des taux très bas (médiane à 1,2% pour les états membres), excepté pour la Belgique où ce taux est modéré (14,8% à 16,2%) et en Lituanie où ce taux est élevé (30,1%). Concernant les veaux de moins d'un an, ces observations sont confirmées, mais le niveau de résistance au C3G est plus bas (de 1,2% à 5,3%), avec une diminution observée entre 2009 et 2017, notamment en Belgique (EFSA, 2020).

Les échantillons pour les données humaines étant d'origine hospitalière (*E. coli* pathogènes) tandis que ceux pour les données animales étant prélevés en abattoir (*E. coli* indicatrices), la comparaison des résistances observées n'est pas aisée. C'est pourquoi la mise en place d'un réseau de surveillance animal, l'EARS-Vet est en cours (Mader *et al.*, 2021), basé sur le même mode de fonctionnement que l'EARS-net humain.

De plus, les données dans une même espèce ne sont pas forcément comparables d'une année à l'autre, puisque les méthodologies évoluent au fil du temps. Cela est également à prendre en compte lors du suivi des taux de résistances observés.

Figure 14 : Pourcentage d'*Escherichia coli* invasives résistantes aux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et/ou ceftriaxone et/ou ceftazidime) (14a) et aux carbapénèmes (imipénème et/ou méropénème) (14b) chez l'être humain, par pays de l'Union Européenne/Espace Économique Européen pour 2019

14a



14b



Source : rapport EARS-Net 2020

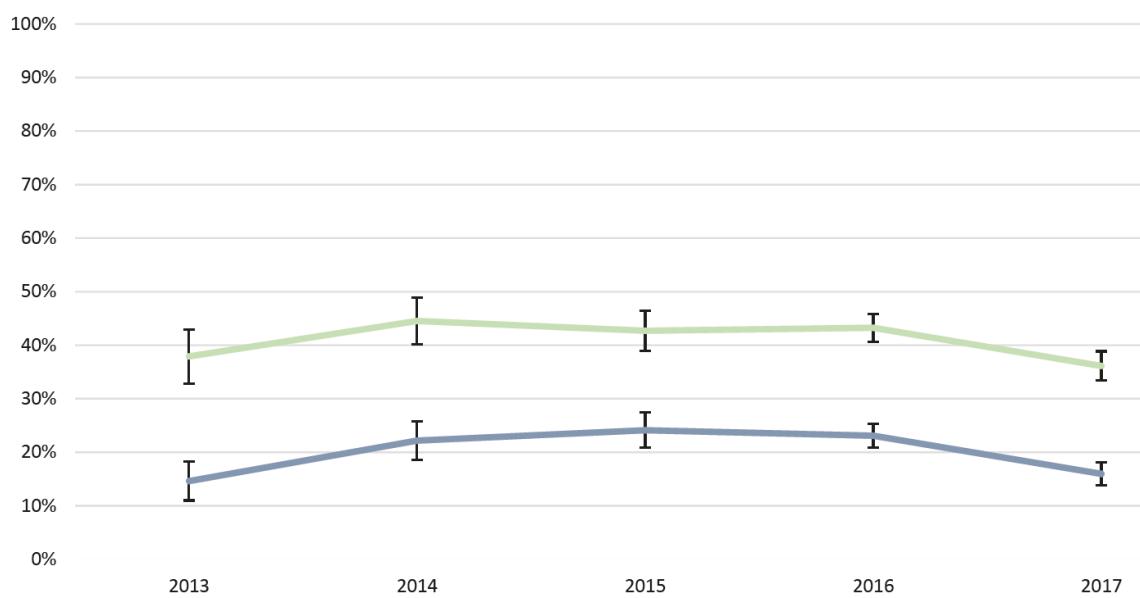
En Wallonie, l'Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA) observe également une résistance d'environ 85% à l'amoxicilline (AMX) pour les *E. coli* isolées de pathologies digestives chez des veaux. La résistance au ceftiofur (XNL), une C3G, est quant à elle légèrement inférieure à 20%, tout comme la résistance à la cefquinome (CFQ), une C4G. De plus, les phénotypes BLSE sont observés à un taux de 16% tandis que les phénotypes AmpC sont à 6% (ARSIA, 2017). En Flandre, le laboratoire régional « *Dierengezondheidszorg Vlaanderen* » (DGZ) observe également, pour l'année 2020, des taux de résistances de plus de 80% pour l'AMX et d'environ 20% pour le XNL ainsi que pour la CFQ (DGZ, 2021).

En France, l'agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement et travail (ANSES) fait état dans son bilan de 2019 de résistances chez *E. coli* de bovins autour de 2% pour les C3G/C4G. Les jeunes veaux en sont la source principale, avec près de 3% de résistance contre moins d'1% pour les bovins adultes. Pour les cas de diarrhée néonatale, la résistance au XNL est de 3% tandis que celle à la CFQ est de 6%. Cependant, 85% des isolats de gastro-entérite néonatale présentent une résistance à l'AMX (ANSES, 2020). Ces chiffres sont inférieurs à ceux du rapport de 2016 (ANSES, 2017), ce qui indique une diminution des résistances aux C3G/C4G. Cependant, il semble y avoir une évolution dans les mécanismes de résistance détectés. En effet, en 2016 la résistance au XNL chez les bovins était quasi systématiquement corrélée à la présence d'une BLSE. Cependant, de plus en plus d'AmpC sont détectées en filière bovine, bien que les BLSE restent majoritaires (ANSES, 2020).

Cette diminution apparente des résistances aux C3G et C4G, présentées dans la Figure 15, est une nouvelle positive et encourageante, mais comme l'a également soulevé l'ANSES, l'évolution des gènes et mécanismes de résistance impliqués demeure inconnue. Or, les déterminer permettra de suivre au mieux cette apparente évolution et d'envisager les mesures nécessaires pour contrer le plus efficacement possible ces résistances d'intérêt en santé publique. Ce suivi de l'évolution des gènes de résistance est l'un des buts de ce travail.

Figure 15 : Évolution des résistances d'*Escherichia coli* de bovins en Wallonie (15a), en Flandre (15b) et en France (15c)

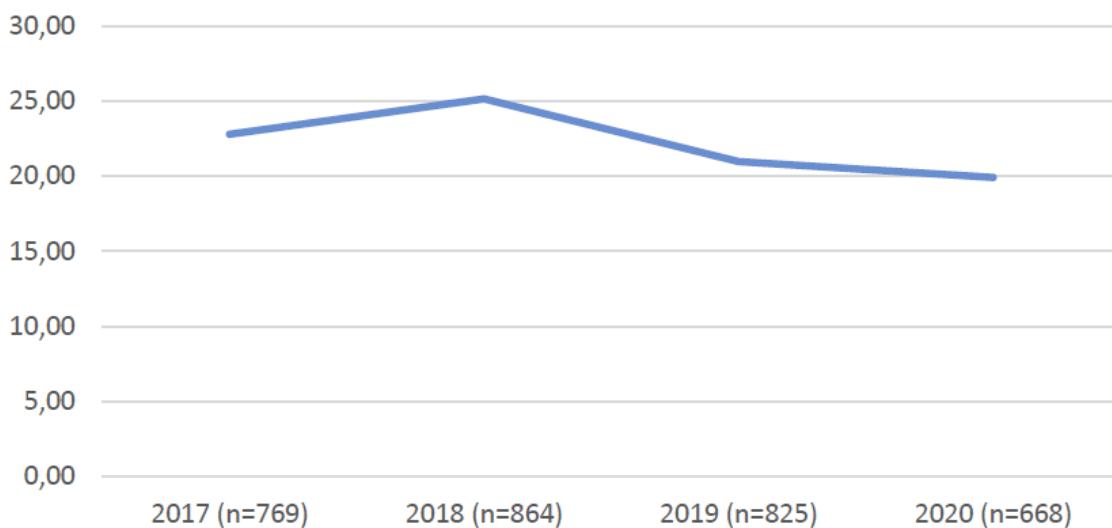
15a



Suivi des résistances exprimées en pourcentage chez *E. coli* d'origine bovine tout âge confondu, à l'exclusion des mammites, aux molécules critiques de 2013 à 2017. En bleu : céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations. En vert : fluoroquinolones.

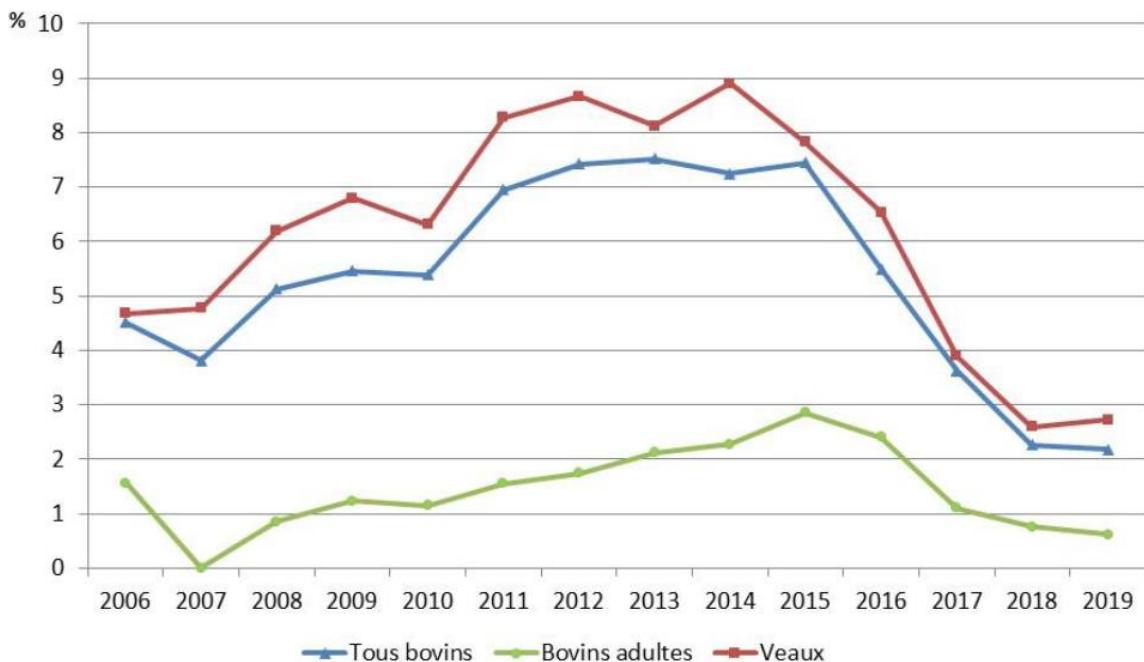
Source de l'image : Rapport antibiogramme ARSIA, 2017.

15b



Suivi des résistances au ceftiofur exprimées en pourcentage chez *E. coli* d'origine bovine tout âge confondu, sur la période 2017-2020.

Source de l'image : DGZ, 2021. Antibioticaresistentie - evolutie 2017-2020

15c

Évolution des proportions de souches d'*Escherichia coli* non-sensibles au ceftiofur chez les bovins de 2006 à 2019.

Source de l'image : Résopath bilan 2019, ANSES, 2020.

Objectifs

S'inscrivant dans le principe du *One Health*, ce travail de thèse étudiera différents aspects de la résistance aux β-lactamines retrouvée chez des *E. coli* de veaux diarrhéiques et/ou septicémiques. Pour ce faire, trois périodes de collecte des isolats d'*E. coli* ont été réalisées lors de trois saisons de vêlage successives. Les différentes études réalisées aborderont non seulement les aspects phénotypiques et génétiques de ces résistances, mais également les aspects phylogénétique et spatio-temporel, afin de mettre en relation ces différentes facettes de la résistance aux β-lactamines.

Ce travail de thèse a, donc, plusieurs objectifs complémentaires : (i) étudier les phénotypes de résistance aux β-lactamines d'*E. coli* et leur évolution dans la population de veaux diarrhéiques ou septicémiques en Wallonie ; (ii) identifier les gènes *bla* qui y sont associés et comparer des *E. coli* pathogènes et non-pathogènes présentant des phénotypes BLSE et AmpC ; et (iii) analyser les relations phylogénétiques d'un ensemble de ces *E. coli*.

Le premier objectif étudiera les phénotypes de résistance aux β-lactamines, obtenus par antibiogrammes à l'ARSIA, d'*E. coli* provenant de veaux diarrhéiques ou septicémiques en Wallonie. Ce suivi des phénotypes de résistance sera effectué sur sept saisons de vêlage et permettra d'évaluer l'effet de l'Arrêté Royal du 21 juillet 2016. Il sera abordé au travers de l'étude 1 de ce travail, correspondant à un article en préparation.

Le deuxième objectif mettra en œuvre différentes techniques d'analyses génétiques afin d'identifier les gènes de résistances aux β-lactamines présents dans les isolats collectés durant trois saisons de vêlage. Cette identification des gènes *bla* sera accompagnée d'une comparaison du contenu génétique entre *E. coli* pathogènes et non-pathogènes, selon les critères de l'ARSIA (*Cf. Matériels et Méthodes*, point 1.1.1), présentant des résistances de types BLSE et AmpC, qui sont parmi les résistances plus problématiques de nos jours. Cet objectif est traité dans l'étude 2, qui correspond à un article sous presse, ainsi que dans les études 3 et 4, concernant des articles respectivement soumis pour publication et en préparation.

Pour finir, le troisième objectif s'inscrit dans la lignée des deux premiers, puisqu'il permettra grâce au séquençage des génomes totaux de plusieurs centaines de souches de déterminer les relations phylogénétiques entre les souches analysées, qui seront mises en relation avec la localisation d'origine des isolats. La répartition géographique des résistances sera ainsi obtenue et la présence de foyers localisés identifiée, indiquant une éventuelle circulation locale de certaines souches résistantes ou de certains mécanismes de résistance. Cet objectif est étudié dans l'étude 4, avec un article en préparation.

Section expérimentale

1. Matériel et Méthodes

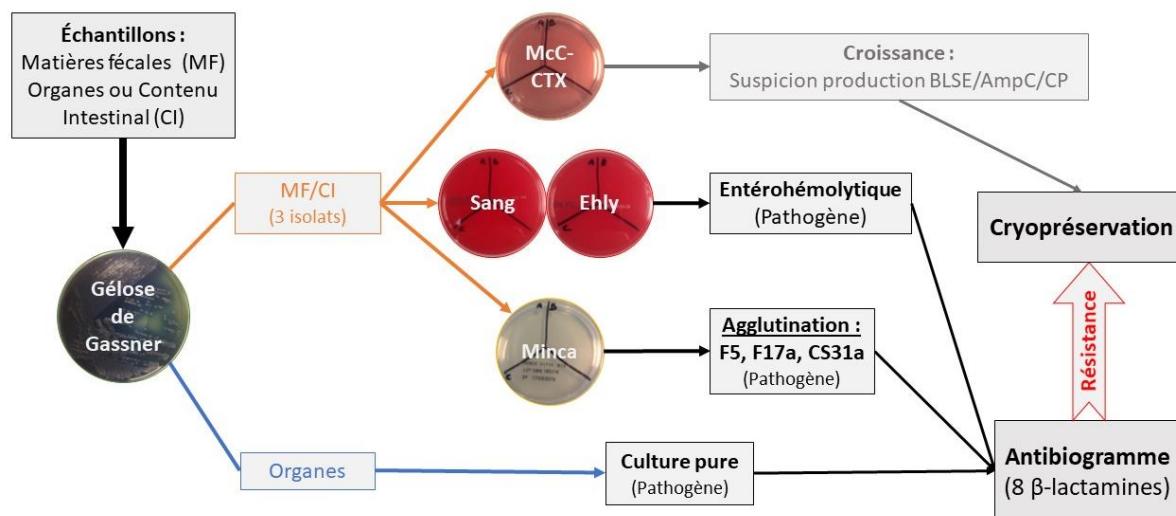
1.1 Échantillonnage

La collecte des isolats d'*E. coli* s'est déroulée sur 4 mois, de novembre à février inclus, pendant 3 saisons de vêlage successives, de 2017-2018 à 2019-2020. Cette étape est très importante puisqu'elle constitue les échantillons à la base des diverses analyses.

Les isolats ont été récoltés à l'ARSIA sur base de deux critères : leur résistance aux β -lactamines (au minimum à l'amoxicilline) observée à l'antibiogramme et/ou leur croissance sur le milieu MacConkey contenant 1mg/L de Cefotaxime (McC-CTX) (Led Techno, Lienden, Pays-Bas), sélectionnant les résistances de types BLSE, AmpC et CP.

Les isolats provenaient soit de cas de diarrhée pour lesquels les matières fécales (MF) étaient envoyées pour analyses, soit de veaux autopsiés desquels des échantillons de contenu intestinal (CI) et d'organes étaient prélevés. Les différentes étapes décrites dans cette section sont reprises dans la figure 16.

Figure 16 : Étapes de la collecte des isolats d'*Escherichia coli* pathogènes et non-pathogènes provenant de bovins en Wallonie



McC-CTX : Milieu MacConkey-Céfotaxime, avec 1mg/l de céfotaxime. Sang : gélose Columbia au sang. Ehly : Milieu de détection des entérohémolysines, Globules rouges de mouton lavés. STEC : *E. coli* productrice de Shiga-toxine. BLSE : β -lactamases-à-spectre-étendu. AmpC : Céphalosporinases. CP : Carbapénémases.

Source : travail personnel

1.1.1 Les matières fécales et contenus intestinaux

Les MF et CI ont été ensemencés sur gélose de Gassner (ThermoFisher, Merelbeke, Belgique), sélective pour les entérobactéries et, après une nuit de croissance à une température de 36 +/- 1°C, 3 colonies de type coliforme, présentant une couleur bleue due à la fermentation du lactose, étaient repiquées simultanément sur 4 milieux gélosés :

- Minca (Generon, San Prospero, Italie) pour détecter la production des *fimbriae* F5 et F17 des *E. coli* entéro-toxinogènes ainsi que l'antigène CS31a d'*E. coli* potentiellement septicémiques par des tests d'agglutination sérologique (*Cf.* Point 1.2, ci-dessous) ;
- Columbia au sang (ThermoFisher, Merelbeke, Belgique) et Entérophémolysine (ThermoFisher, Merelbeke, Belgique) pour détecter les colonies productrices d'une hémolysine classique (*E. coli* potentiellement septicémiques) ou d'une entérophémolysine (*E. coli* potentiellement entéropathogènes ou Shigatoxinogènes), respectivement ;
- McC-CTX (Led Techno, Lienden, Pays-Bas) pour mettre en évidence des souches résistantes à la céfotaxime (*E. coli* potentiellement productrices de BLSE et/ou AmpC et/ou CP).

Dès qu'une colonie présentait un virulotype positif au test d'agglutination (F5, F17, CS31a) ou un aspect entérophémolytique, elle était testée par antibiogramme (une souche par virulotype et par cas). Lorsque le résultat montrait une résistance aux β-lactamines, la souche était conservée ainsi que les 2 autres souches coliformes repiquées en même temps (que leur virulotype soit positif ou négatif). Les trois souches étaient également conservées, si au minimum l'une des trois poussait sur le milieu McC-CTX.

De plus, l'identification par MALDI-TOF (pour *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*) a été réalisée sur toutes les colonies croissant sur le milieu Minca, repiquées à partir de la gélose de Gassner. Les seules ayant été mises en collection sont celles qui ont été confirmées comme étant *E. coli*.

1.1.2 Les organes internes

Dès qu'une culture provenant d'un organe était pure sur le milieu de Gassner, les isolats étaient considérés comme étant pathogènes. Ils étaient alors analysés par antibiogramme et conservés si une résistance aux β-lactamines était mise en évidence. À partir de la gélose de Gassner, deux colonies étaient repiquées sur le milieu Minca pour l'identification par MALDI-TOF et la réalisation du test d'agglutination. Ce dernier n'avait qu'un rôle informatif puisque même en cas de résultat négatif, l'isolat provenant d'une culture pure était considéré comme pathogène et testé par antibiogramme.

1.1.3 Cryopréservation

La cryopréservation était commune à l'ensemble des souches. Celle-ci a été réalisée à partir d'une culture liquide en peptone végétal. Un isolat a été ensemencé dans 5 ml de peptone végétal liquide. Ce bouillon fut placé à 37°C pendant 16 à 18 heures, avant d'être transporté jusqu'à la Faculté de Médecine

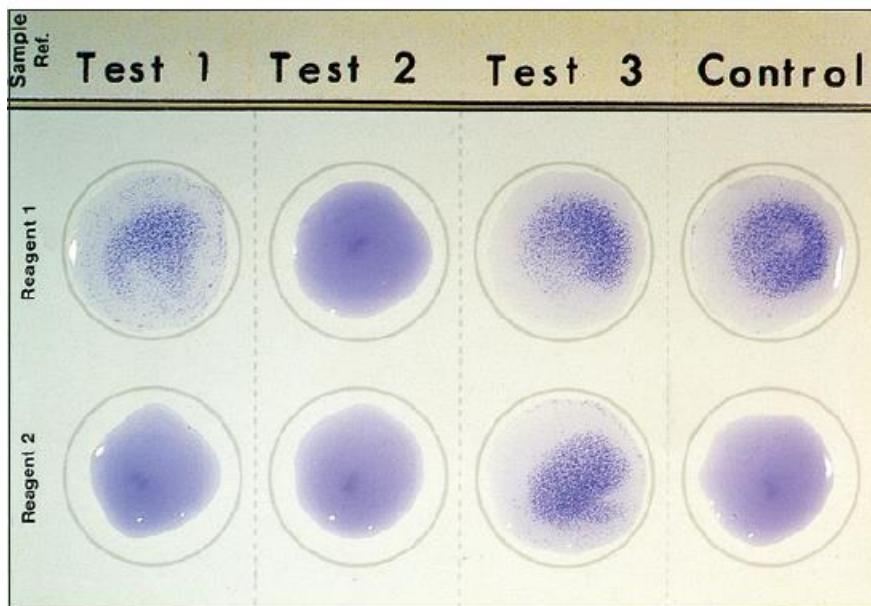
Vétérinaire de l'Université de Liège (FMV) pour l'étape de congélation. Là, 1 ml de bouillon a été mélangé à 1 ml de glycérol (80%), pour obtenir un mélange final avec 40% de glycérol, qui fut alors congelé à -80°C.

1.2 Agglutinations sérologiques

L'utilisation de sérum (Biovac, Beaucouzé, France) contenant des anticorps ciblant les *fimbriae* F5 et F17, ainsi que l'antigène CS31a permet de contrôler l'expression de l'un de ces facteurs de virulence.

Une colonie est ainsi mise en contact avec une goutte de chaque sérum, permettant de détecter l'un des antigènes. L'isolat est alors considéré comme pathogène, exprimant le virulotype détecté (F5, F17 ou CS31a), si une agglutination est observée. Un exemple est présenté dans la figure 17.

Figure 17 : Test de séro-agglutination *d'Escherichia coli* pour la *fimbriae* F5



Des suspensions d'*E. coli* sont réalisées (test 1 à 3) dans le sérum immun (*reagent 1*) contenant les anticorps spécifiques à F5 liée sur des particules de latex, et dans un sérum contrôle, ne contenant pas d'anticorps mais seulement les particules de latex (*reagent 2*). Le test 1 est positif pour la *fimbriae* F5, car une agglutination est observée avec le sérum mais pas avec la solution contrôle. Le test 2 est négatif, il n'y a pas d'agglutination. Le test 3 est un test invalide car l'*E. coli* a auto-agglutiné, c'est-à-dire qu'il y a une agglutination avec le sérum ainsi qu'avec la solution contrôle. Le contrôle contient l'antigène de la *fimbriae* F5 ciblé par le sérum.

Source : Markey *et al.*, 2013. Page 253

1.3 Antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés par la technique de diffusion de disques sur gélose, ou *disk diffusion assay* (DDA), suivant les recommandations de l'EUCAST. Une colonie était prélevée à l'aide d'un inoclic (de chez i2a), un fil de platine à usage unique permettant l'inoculation de bactéries avec une charge reproductible, mise en suspension dans 5 ml de NaCl 0,9% et étalée, à l'aide d'un écouvillon, sur une gélose Mueller-Hinton. L'étalement se faisait dans 3 directions: verticale, horizontale et en diagonale. Les pastilles d'antibiotiques étaient alors placées, endéans les 15 minutes, sur la gélose avant d'incuber celle-ci à 35 +/- 2°C pour 16 à 24h.

Le lendemain, les résultats étaient lus à l'aide d'un Sirscan (I2A) qui compare les diamètres mesurés à la base de données pour obtenir les résultats bruts, basés sur les VC du CASFM-vet (VetCAST) : Résistant (R), Sensible à haute dose (I) ou Sensible (S). Les mesures des diamètres étaient conservées pour chacun des isolats et utilisées pour l'analyse du profil phénotypique. Ce dernier permettra de classer les isolats dans l'une des cinq catégories de résistance : BLSR, AmpC, AmpC-like, BLSE ou CP (Tableau III). Pour être classée comme BLSE, il est nécessaire, en plus du profil de résistance défini dans le tableau III, d'observer une différence de diamètre supérieure à 5mm entre une C3G et cette même C3G associée à un inhibiteur des BLAs (ici l'acide clavulanique), ainsi qu'une synergie entre les céphalosporines (C3G et C4G) et l'acide clavulanique, celle-ci donnant une image spécifique « en bouchon de champagne » (Figure 8).

Tableau III : Phénotypes de résistance pouvant être observés pour les huit β-lactamines testées par antibiogramme, via la diffusion des disques sur gélose

β-lactamines		AMX	AMC	XNL	CFQ	CTX	CTC	FOX	MER
		amino-pénicilline	amino-pénicilline + inhibiteur BLA	C3G	C4G	C3G	C3G + inhibiteur BLA	C2G	carbapénème
Phénotypes	BLSR	R	S/I/R	S	S	S	S	S	S
	BLSE	R	S/I	R	R	R	S/I	S	S
	AmpC	R	R	R	R	R	R	R	S
	AmpC-like	R	S/I/R	S	S	S	S	I/R	S
	CP	R	R	R	R	R	R	R	R

AMX : amoxicilline. AMC : amoxicilline associée à l'acide clavulanique. XNL : ceftiofur. C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération. CFQ : cefquinome. C4G : Céphalosporine de 4^{ème} génération. CTX : céfotaxime. CTC : céfotaxime associée à l'acide clavulanique. FOX : céfoxitine. C2G : Céphalosporine de 2^{ème} génération. MER : méropénème. BLSR : β-lactamases-à-spectre-restréint. BLSE : β-lactamases-à-spectre-étendu. AmpC : céphalosporinases. AmpC-like : BLSR avec résistance à la céfoxitine. CP : carbapénémases. S : sensible. I : sensible à haute dose. R : résistant.

2. Résultats globaux : description de la collection

Les résultats présentés dans cette section ne seront pas repris en totalité dans les études qui suivront, puisque pour chacune d'entre-elles, un choix a été effectué concernant les *E. coli* étudiées, principalement sur base de leur phénotype de résistance.

2.1 Collection

Dans le cadre de ce travail, un total de 3545 *E. coli* a été collecté à partir d'échantillons de MF (2550 isolats) de veaux diarrhéiques ou de CI (728 isolats) et d'organes internes (267 isolats) de veaux autopsiés. Leurs virulotypes sont donc variés, et présentés dans le tableau IV.

Seuls les isolats de MF et de CI ont été ensemencés sur le milieu McC-CTX, soit 3278 isolats. Les résultats obtenus sont les suivants : 1120 isolats croissent sur le milieu, dont 28 présentent une poussée légère, classé comme résultat douteux, et 2158 isolats n'ont pas poussé sur le milieu.

2.2 Phénotypes de résistance

Les différents phénotypes de résistance de ces *E. coli* se retrouvent également dans le tableau IV. Aucun phénotype CP n'a été mis en évidence dans les *E. coli* isolées et étudiées. Le phénotype BLSR est prédominant (23,9%) suivi par les phénotypes BLSE (11,2%). De plus, de nombreux isolats présentant un phénotype AmpC-like ont été détectés par leur croissance sur le milieu McC-CTX. Un grand nombre d'isolat n'a cependant pas été testé par antibiogramme (57,2%). Cela est lié à la méthode de collecte, où les 3 isolats étaient récoltés bien qu'un seul soit testé.

Tableau IV : Caractéristiques de virulence et phénotypes de résistance aux β-lactamines des *Escherichia coli* isolées de bovins en Wallonie pendant 3 saisons successives de vêlage (de 2017-2018 à 2019-2020)

Test d'agglutination	F5 (%)		F17a (%)		CS31a (%)				N (%)				? (%)			Total		
Production d'une (entéro)hémolysine	N	NA	Hly	N	NA	Ehly	Hly	N	NA	Ehly	Hly	N	NA	?	Ehly	N	NA	
Phénotype de résistance	Sensible	0	0	0	1 (0,0)	0	0	0	3 (0,1)	0	1 (0,0)	0	1 (0,0)	0	1 (0,0)	0	0	8 (0,2)
	BLSR	70 (2,0)	6 (0,2)	1 (0,0)	111 (3,1)	27 (0,8)	6 (0,2)	4 (0,1)	424 (12)	54 (1,5)	19 (0,5)	2 (0,1)	31 (0,9)	88 (2,5)	1 (0,0)	2 (0,1)	0 (0,0)	847 (23,9)
	BLSE	3 (0,1)	0	0	28 (0,8)	7 (0,2)	0	1 (0,0)	106 (3)	17 (0,5)	0	2 (0,1)	207 (5,8)	21 (0,6)	1 (0,0)	1 (0,0)	2 (0,1)	396 (11,2)
	AmpC	0	0	0	5 (0,1)	1 (0,0)	0	0	2 (0,1)	0	1 (0,0)	0	36 (1)	7 (0,2)	0	0	0	52 (1,5)
	AmpC-like	0	0	0	38 (1,1)	3 (0,1)	0	0	61 (1,7)	7 (0,2)	0	0	92 (2,6)	11 (0,3)	0	0	4 (0,1)	216 (6,1)
	Non-testé	121 (3,4)	0	0	156 (4,4)	0	1 (0,0)	3 (0,1)	680 (19,2)	0	23 (0,6)	28 (0,8)	993 (28)	0	2 (0,1)	6 (0,2)	13 (0,4)	2026 (57,2)
	Total	194 (5,5)	6 (0,2)	1 (0,0)	339 (9,6)	38 (1,1)	7 (0,2)	8 (0,2)	1276 (36)	78 (2,2)	44 (1,2)	32 (0,9)	1360 (38,4)	128 (3,6)	4 (0,1)	10 (0,3)	19 (0,5)	1 (0,0)

Nombre d'isolat associé au pourcentage entre parenthèses. F5 : *fimbriae* F5. F17a : sous-unité a de la *fimbriae* F17. CS31a : sous-unité a de l'antigène CS31. N : négatif. ? : donnée manquante. Ehly : production d'une entérohémolysine. Hly : production d'une hémolysine. NA : non-applicable, concerne les *E. coli* provenant d'organes internes de veaux autopsiés. BLSR : β-lactamases-à-spectre-restréint. BLSE : β-lactamases-à-spectre-étendu. AmpC : céphalosporinases. AmpC-like : BLSR avec résistance à la céfoxidine.

Section expérimentale

Étude 1 :

Sept ans de résistances aux β -lactamines chez des *Escherichia coli*
isolées de veaux diarrhéiques et/ou septicémiques en Wallonie

Cette étude a analysé les résultats d'antibiogrammes obtenus à l'ARSIA pendant sept saisons de vêlage, de novembre à février inclus, de la saison 2014-2015 jusqu'à la saison 2020-2021. Le nombre d'*E. coli* est variable suivant les différentes saisons de vêlage, avec un nombre médian de 495 *E. coli* par saison et un nombre moyen de 560 *E. coli* par saison. Les profils de résistance ont été classés phénotypiquement en quatre catégories : BLSR, BLSE, AmpC et AmpC-like, le profil CP n'ayant pas été détecté dans les *E. coli* d'origine bovine. La majorité des résistances aux β-lactamines observées sont de types BLSR, bien qu'un nombre non négligeable de BLSE soit aussi détecté.

L'évolution montre une diminution globale des résistances à partir de la saison 2016-2017 (S3) jusqu'à la saison 2019-2020 (S6). Une légère augmentation semble apparaître de S6 à S7 (2020-2021), mais celle-ci n'est pas significative.

Lorsque les phénotypes de résistances sont étudiés séparément, il y a deux observations majeures. La première est le taux élevé et croissant de résistance de type BLSR. La seconde est la diminution des résistances de types BLSE, AmpC et AmpC-like. Concernant cette dernière catégorie, il est important de noter une augmentation entre S6 et S7.

Cette étude permet de voir les effets de l'AR-2016 réglementant l'utilisation des antibiotiques classifiés comme « critiques » en médecine humaine. En effet, le premier impact concerne le nombre d'antibiogrammes réalisés, qui a plus que doublé après la publication de cet AR. Le second impact est la diminution observée des résistances aux céphalosporines, notamment de 3^{ème} et 4^{ème} générations. Cependant, poursuivre la surveillance est indispensable, notamment pour les AmpC dont la résistance a augmenté entre les deux dernières saisons de vêlage.

L'article concernant cette étude est en préparation.

Article en préparation**Seven year evolution of β -lactam resistance phenotypes in *Escherichia coli* isolated from young diarrheic and septicaemic calves in Belgium.**

Guérin V.^{1*}, Farchi A.², Thiry D.¹, Cawez F.³, Mercuri P.S.³, Galleni M.³, Mainil J.^{1**}, Saulmont M.^{4**}

1. Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, FARAH and Faculty of Veterinary Medicine, ULiège, Belgium

2. CREA, École des Ponts, EDF R&D, IPSL, Marne-la-Vallée, France

3. Biological Macromolecules, Department of Life Sciences, Center for Protein Engineering (CIP), ULiège, Belgium, ULiège, Belgium

4. Regional Animal Health and Identification Association (ARSIA), Ciney, Belgium

* Corresponding authors

** Have equally contributed to this work

Abstract

Antimicrobial resistance is a major worldwide hazard, therefore a list of "critically important antimicrobials for human medicine", with restrictive use in veterinary medicine was proposed by the World Health Organisation. In Belgium, this regulation took form in a Royal Decree (RD) in 2016. The use of carbapenems was prohibited and the use of 3rd and 4th generation cephalosporins (3GC/4GC) was strictly controlled in food-producing animals. In Gram-negative bacteria, the acquired resistance to β -lactam antibiotics is most frequently mediated by the production of a β -lactamase (BLA). This study follows over seven calving seasons the resistance to β -lactam antibiotics in *Escherichia coli* isolated from young diarrheic or septicemic calves in Belgium, to determine the impact of the RD. The number of *E. coli* is variable over the calving seasons, with a median rate at 495, and an average at 560 *E. coli*.

Phenotypic resistance to eight β -lactams was determined by disk diffusion assay, and isolates were classified in four resistance profiles: Narrow-Spectrum-BLA (NSBL); Extended-Spectrum-BLA (ESBL); NSBL with cefoxitin resistance (AmpC-like) and Cephalosporinases (AmpC). No carbapenemase was detected, but different rates were observed for the four other profiles over the calving seasons.

The impacts of the RD were an increasing rate of sensitivity tests, a major decrease of resistance level to 3GC/4GC but also a change in the resistance profiles observed, with an increase of NSBL profiles.

Introduction

In Gram-negative bacteria, the acquired resistance to β -lactam antibiotics is most frequently mediated by the production of plasmid-encoded β -lactamase (BLA) enzymes hydrolysing the β -lactam ring with different inactivation spectra: from “Narrow-Spectrum-BLA” (NSBL) and “NSBL with cefoxitin resistance” (AmpC-like) to “Extended-Spectrum-BLA” (ESBL), “Cephalosporinases” (AmpC) and “Carbapenemases” (CP) [1, 2]. Amongst the Gram-negative bacteria, the first BLA enzyme was actually described in the species *Escherichia (E.) coli* [3] that is naturally present in the intestinal microbiota of humans and different animal species. Nevertheless, *E. coli* is also commonly involved in severe infections, both in humans and in animals and several antibiotics, including the β -lactams are therefore widely used in human and veterinary medicine contributing to the development of resistances [4]. Since the 1960s, *E. coli* has indeed acquired several genes coding for many families of NSBL, ESBL, AmpC, and CP [1, 2]. Moreover, these different BLA families can comprise several dozens of variants [5]. For instance, the most common ESBL as much in humans than in animals belong to the CTX-M family, which comprises more than 150 variants.

Since 2010, the World Health Organization (WHO), the World Organization for Animal Health (OIE) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) have joined forces to fight antimicrobial resistance. A.o., they proposed a list of "critically important antimicrobials for human medicine", with restrictive use in veterinary medicine. In particular, the latest generation cephalosporins, from 3rd to 5th (3GC to 5GC) are categorized as “critically important and highest priority” and the carbapenems, monobactams, aminopenicillins and penicillins, both associated with β -lactams inhibitors, as “critically important” [6]. The resistance of bacteria in hospital, especially of Gram-negative bacteria, to these last resort antibiotics is indeed a major public health hazard worldwide [7]. A following of these resistances in human and animals was therefore applied in European Union.

Even though there are significant differences between European countries, the highest resistance rate in humans is observed for the aminopenicillins (57.1%) followed by the 3GC (15.1%) while the resistance to carbapenems remains rare (0.3%) in *E.coli* [8]. In poultry, porcine and bovine populations, the situation is similar for the aminopenicillins. The resistance to 3GC is rare or at very low level, except for Belgium where the resistance rate is moderate and in Lithuania where it is high. The resistance to carbapenems has not been detected. For calves under 1 year of age, a high resistance rate to aminopenicillins (ampicillin), a lower level of resistance to 3GC (cefotaxime) with a decrease between 2009 and 2017, and no resistance to carbapenems (meropenem) are reported [9]. Nevertheless, the resistance to β -lactams of *E. coli* in the human population increased more slowly between 2015 and 2019 than between 2002-2012 [8] and the level of resistance to 3GC (cefotaxime) in young calves also decreased between 2009 and 2017 [9].

Different European countries have indeed issued regulations of the use of antibiotics in food-producing-animals. In Belgium, for instance, a Royal Decree was published in summer 2016: the use of carbapenems was prohibited and the use of 3rd and 4th generation cephalosporins was strictly controlled [10]. As a possible consequence, a decrease of ESBL-producing pathogenic *E. coli* isolated from calves with diarrhoea and/or septicaemia was observed during the 2016-2017 calving season, by the two Belgian routine diagnostic regional laboratories following the resistance amongst pathogenic enterobacteria from farm animals (cattle, small ruminants, pigs and poultry): “Association Régionale de Santé et d’Identification Animales” (ARSIA) in Wallonia and “DierenGezondheidZorg” (DGZ) in Flanders [11, 12].

The purpose of this study was therefore to compare the evolution of the resistance phenotypes to β-lactams of septicaemic and diarrheagenic *E. coli* isolated from young calves during seven calving seasons, from 2014-2015 to 2020-2021, with emphasis on the ESBL and AmpC phenotypes.

Material and Methods

E. coli isolates

Pathogenic *E. coli* were isolated between November and February from 2014 to 2021 as part of the routine diagnostic procedure at ARSIA. They came (i) from faeces of diarrheic or intestinal contents of necropsied Belgian calves on the basis of a positive agglutination test (Biovac, Beaucouzé, France) for *fimbriae* F5 and/or F17a (enterotoxigenic *E. coli*) or for the CS31a surface antigen and/or on the basis of the production of an enterohaemolysin (Ehly) on washed sheep blood agar plates (90% are enteropathogenic and Shigatoxigenic *E. coli*) [13, 14] or (ii) in pure culture from internal organs of calves suffering invasive infection.

Disk Diffusion Assay

The disk diffusion assay (DDA) was routinely performed on the pathogenic *E. coli* with 8 β-lactams: amoxicillin (AMX), amoxicillin + clavulanic acid (AMC), ceftiofur (XNL), cefquinome (CFQ), cefotaxime (CTX), cefotaxime + clavulanic acid (CTC), cefoxitin (FOX) and meropenem (MER). The whole procedure including the analysis of the results followed the EUCAST/CASFM guidelines. The resistance profiles were classified in five categories (Table 1) as previously described [1]: NSBL, ESBL, AmpC, AmpC-like and CP.

Table I: Resistance profiles for eight β -lactams observed at the disk diffusion assay, adapted from Guérin *et al.*, 2021

Resistance profiles	Antibiotics							
	AMX	AMC	XNL	CFQ	CTX	CTC	FOX	MER
NSBL	R	S/I/R	S	S	S	S	S	S
AmpC-like	R	R	S	S	S	S	I/R	S
AmpC	R	R	R	R	R	R	R	S
ESBL	R	S/I	R	R	R	S/I	S	S
CP	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistant. I: intermediate. S: susceptible. AMX: amoxicillin. AMC: amoxicillin + clavulanic acid. XNL: ceftiofur. CFQ: cefquinome. CTX: cefotaxime. CTC: cefotaxime + clavulanic acid. FOX: cefoxitin. MER: meropenem. NSBL: narrow-spectrum- β -lactamase. AmpC-like: NSBL with non-sensitivity to FOX. AmpC: cephalosporinase. ESBL: extended-spectrum- β -lactamase. CP: carbapenemase.

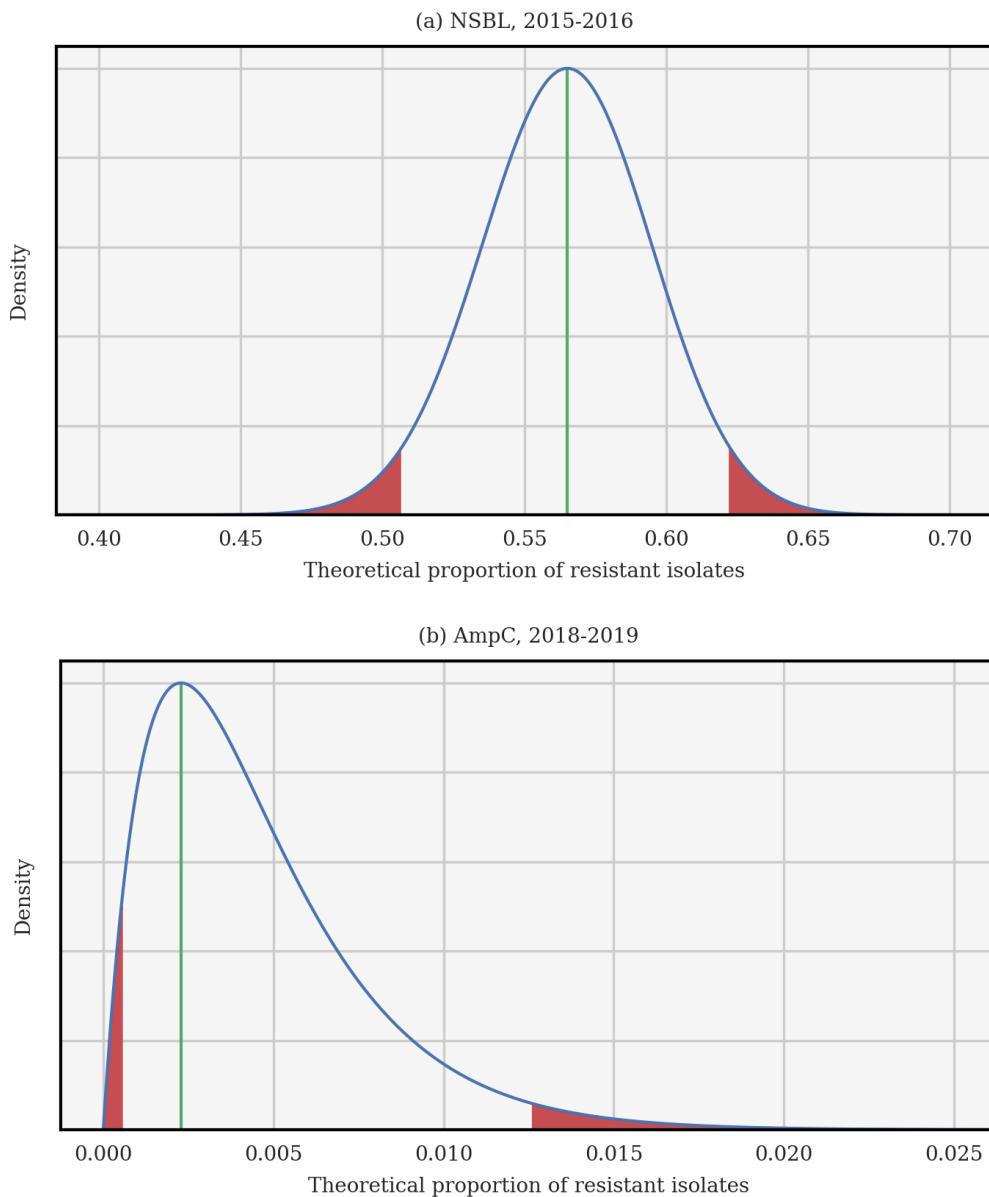
Statistical analysis

A Bayesian inversion is applied independently to each resistance category and each calving season. The proportion of resistant isolates p is treated as a random variable, whose a priori probability density function (PDF) is uniform on the interval $[0, 1]$. Each individual test is a Bernoulli trial and hence the likelihood of observing a certain proportion of resistant isolates can be computed using the Binomial distribution. Finally, the a posteriori PDF of p is obtained using Bayes' theorem. This a posteriori PDF can be used to compute several estimates such as the maximum a posteriori (the most probable value of p) and the 95% confidence interval. In each case, the Bayesian inversion provides an a posteriori PDF for the theoretical proportion of resistant isolates p as well as the associated 95% confidence interval. Two examples are illustrated in Figure 1: the 2nd season NSBL (2015-2016), for which the PDF of p is almost Gaussian and the 95% confidence interval is centred around the maximum a posteriori; and the 5th season AmpC (2018-2019), for which the PDF of p is skewed and the 95% confidence interval is not centred.

For each resistance category, the evolution of p over consecutive calving seasons is examined using a one-sided Fisher's exact test. The evolution is considered significant if the p-value is lower than 0.05, in other words if the probability of observing more extreme results is lower than 5% under the null hypothesis (when the evolution of p does not coincide with the observations). Furthermore, the a posteriori PDF can be used once again to compute the probability that the evolution of p coincides with the observations. This probability is a direct information on the evolution of p and constitutes a complementary diagnostic to confirm or infirm the statistical significance test (which is an indirect information on the evolution of p). The entire statistical analysis is performed using Python 3, using in particular scipy's implementation of Fisher's exact test [15].

Figure 1: A posteriori probability density function of the theoretical proportion of resistant isolates p for the 2nd season NSBL (a) and for the 5th season AmpC (b)

In each case the density is drawn using a continuous blue line, a vertical green line shows the maximum a posteriori, and the 95% confidence interval is delimited in red.



Results

For each resistance category and each calving season, the number of resistant isolates, their origins and the total number of tested isolates are both reported in Table II. The results of Fisher's exact test (the p-value) and the Bayesian inversion (the probability), for the evolutions of each resistance category, are reported in Table III. The evolution of p over the seasons is illustrated for each category in Figure 2.

Table II: Number and proportion of *Escherichia coli* isolates tested by disk diffusion assay for each calving season (from 2014-2015 to 2020-2021)

Calving season and origin of <i>Escherichia coli</i>	Resistance profiles (%)					Total
	Susceptible	NSBL	ESBL	AmpC	AmpC-like	
S1	63 (15,1)	232 (55,5)	61 (14,6)	36 (8,6)	26 (6,2)	418 (100,0)
	28 (6,7)	147 (35,2)	28 (6,7)	12 (2,9)	13 (3,1)	228 (54,5)
	35 (8,4)	85 (20,3)	33 (7,9)	24 (5,7)	13 (3,1)	190 (45,5)
	45 (12,5)	204 (56,5)	68 (18,8)	32 (8,9)	12 (3,3)	361 (100,0)
	20 (5,5)	114 (31,6)	33 (9,1)	11 (3,0)	6 (1,7)	184 (51,0)
	25 (6,9)	90 (24,9)	35 (9,7)	21 (5,8)	6 (1,7)	177 (49,0)
S2	96 (11,1)	505 (58,3)	149 (17,2)	69 (8,0)	47 (5,4)	866 (100,0)
	55 (6,4)	301 (34,8)	85 (9,8)	31 (3,6)	20 (2,3)	492 (56,8)
	41 (4,7)	204 (23,6)	64 (7,4)	38 (4,4)	27 (3,1)	374 (43,2)
	94 (13,3)	456 (64,5)	83 (11,7)	25 (3,5)	49 (6,9)	707 (100,0)
	51 (7,2)	304 (43,0)	51 (7,2)	11 (1,6)	34 (4,8)	451 (63,8)
	43 (6,1)	152 (21,5)	32 (4,5)	14 (2,0)	15 (2,1)	256 (36,2)
S5	84 (14,0)	399 (66,6)	68 (11,4)	10 (1,7)	38 (6,3)	599 (100,0)
	57 (9,5)	309 (51,6)	42 (7,0)	5 (0,8)	29 (4,8)	442 (73,8)
	27 (4,5)	90 (15,0)	26 (4,3)	5 (0,8)	9 (1,5)	157 (26,2)
	79 (16,0)	342 (69,1)	44 (8,9)	5 (1,0)	25 (5,1)	495 (100,0)
	48 (9,7)	251 (50,7)	31 (6,3)	3 (0,6)	18 (3,6)	351 (70,9)

Intestinal content + organs	31 (6,3)	91 (18,4)	13 (2,6)	2 (0,4)	7 (1,4)	144 (29,1)
S7	72 (15,3)	329 (69,9)	38 (8,1)	13 (2,8)	19 (4,0)	471 (100,0)
	35 (7,4)	220 (46,7)	28 (5,9)	7 (1,5)	16 (3,4)	306 (65,0)
Intestinal content + organs	37 (7,9)	109 (23,1)	10 (2,1)	6 (1,3)	3 (0,6)	165 (35,0)
Total of 7 seasons	533 (13,6)	2467 (63,0)	511 (13,0)	190 (4,9)	216 (5,5)	3917 (100,0)

NSBL: narrow-spectrum-β-lactamase. AmpC-like: NSBL with non-sensitivity to FOX. AmpC: cephalosporinase. ESBL: extended-spectrum-β-lactamase. S1: 2014-2015. S2: 2015-2016. S3: 2016-2017. S4: 2017-2018. S5: 2018-2019. S6: 2019-2020. S7: 2020-2021.

Table III: Results of Fisher's exact test (p-value) for each resistance profile over the seven calving seasons

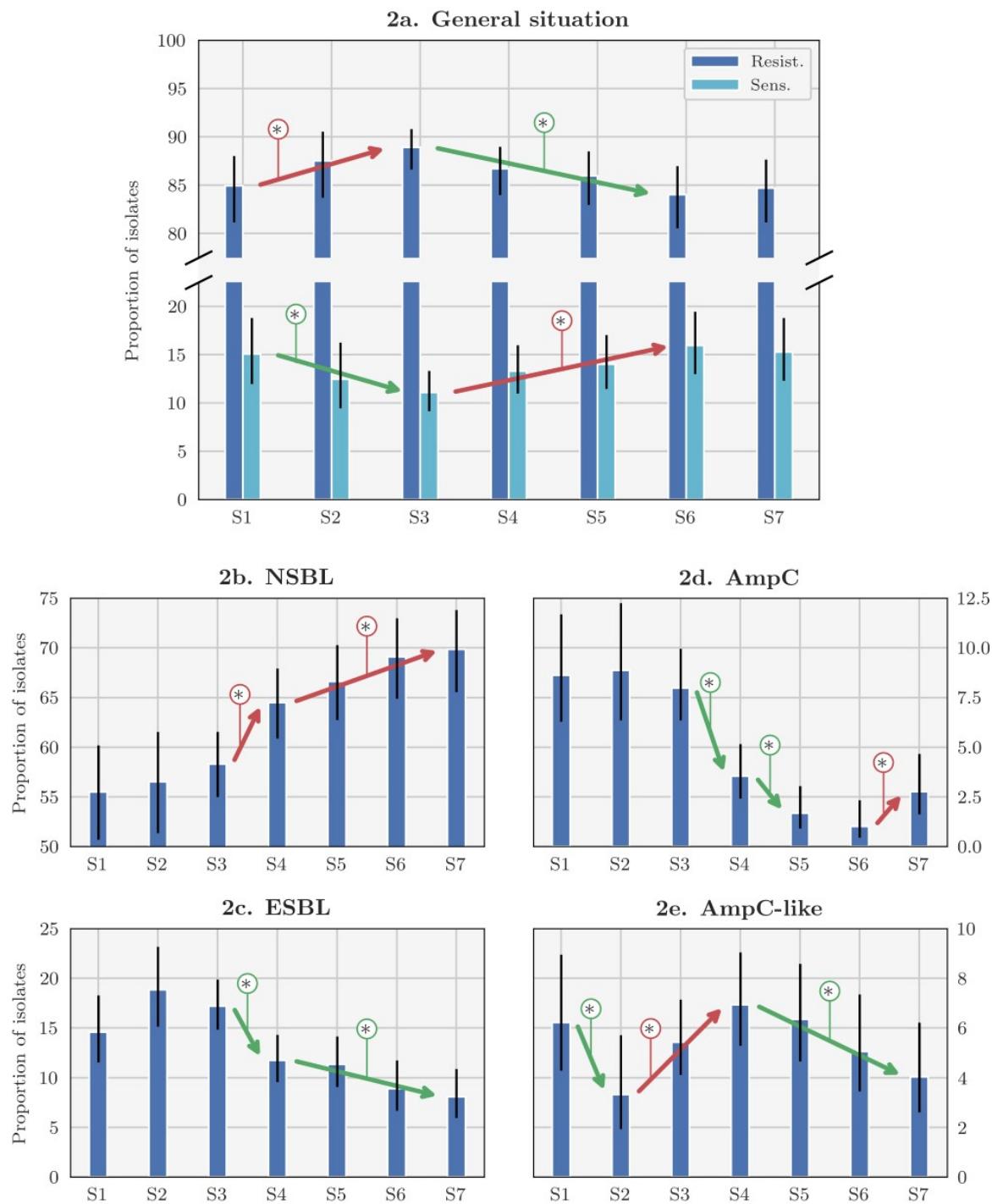
Sensitive		NSBL		AmpC-like		AmpC		ESBL		Global resistance	
Season comparison	p-value	Season comparison	p-value	Season comparison	p-value	Season comparison	p-value	Season comparison	p-value	Season comparison	p-value
S1 > S2	0.17220	S1 < S2	0.41691	S1 > S2	<u>0.04287</u>	S1 < S2	0.50021	S1 < S2	0.06798	S1 < S2	0.17220
S2 > S3	0.27458	S2 < S3	0.30130	S2 < S3	0.07414	S2 > S3	0.33818	S2 > S3	0.27266	S2 < S3	0.27458
S3 < S4	0.10395	S3 < S4	<u>0.00708</u>	S3 < S4	0.12870	S3 > S4	<u>0.00013</u>	S3 > S4	<u>0.00140</u>	S3 > S4	0.10395
S4 < S5	0.38117	S4 < S5	0.22915	S4 > S5	0.37838	S4 > S5	<u>0.02655</u>	S4 > S5	0.44848	S4 > S5	0.38117
S5 < S6	0.20884	S5 < S6	0.20953	S5 > S6	0.21715	S5 > S6	0.25295	S5 > S6	0.10761	S5 > S6	0.20884
S6 > S7	0.42125	S6 < S7	0.42607	S6 > S7	0.27372	S6 < S7	<u>0.03709</u>	S6 > S7	0.36649	S6 < S7	0.42125
S1 < S7	0.50232	S1 < S7	<u>0.00001</u>	S1 > S7	0.09170	S1 > S7	<u>0.00010</u>	S1 > S7	<u>0.00143</u>	S1 > S7	<u>0.50232</u>
<u>Supplementary comparison tests</u>											
S1 > S3	<u>0.02725</u>	S1 < S3	0.18548	S2 < S4	<u>0.00968</u>	NN	NN	S1 < S3	0.13417	S1 < S3	<u>0.02725</u>
S3 < S6	<u>0.00664</u>	S4 < S7	<u>0.03217</u>	S4 > S7	<u>0.02329</u>	NN	NN	S4 > S7	<u>0.02538</u>	S3 > S6	<u>0.00664</u>

NSBL: narrow-spectrum-β-lactamase. AmpC-like: NSBL with non-sensitivity to FOX. AmpC: cephalosporinase. ESBL: extended-spectrum-β-lactamase. S1: 2014-2015. S2: 2015-2016. S3: 2016-2017. S4: 2017-2018. S5: 2018-2019. S6: 2019-2020. S7: 2020-2021. NN: supplementary test Not Necessary in this case.

Figure 2: Evolution of the theoretical proportion of resistant isolates of the seasons for (a) across all categories as well as for (b) NSBL, (c) ESBL, (d) AmpC and (e) AmpC-like categories

In each case, the blue histogram shows the maximum a posteriori and the black line shows the 95% confidence interval. The colored lines with asterisk show the statistically significant difference.

S1: 2014-2015. S2: 2015-2016. S3: 2016-2017. S4: 2017-2018. S5: 2018-2019. S6: 2019-2020. S7: 2020-2021. Important note, for the clarity of the figures, scales were different for each phenotypes.



General evolution of β -lactam resistance

The global evolution of β -lactam resistance observed in pathogenic *E. coli* shows an increasing rate from S1 to S3, followed by a decrease between S3 and S6 (Figure 2a). This evolution is significant statistically, contrary to the small increase from S6 to S7. In the opposite side, the sensitive proportions statistically decrease between S1 and S3 before increasing until S6 (Figure 2a). No CP was detected, therefore this category will not be described in the next sections.

Evolution for NSBL

The only significant evolution of p between consecutive seasons is the increase between S3 and S4 (respectively 2016-2017 and 2017-2018). The increase is slower between each season from S4 (2017-2018) to S7 (2020-2021), but still significant between them. It is remarkable that the rate of NSBL resistance only increases from S1 to S7.

Evolution for ESBL

Visually, p is higher during S2 (2015-2016) than during S1 and S3 ones (respectively 2014-2015 and 2016-2017). Such evolutions are highly probable (probability higher than 0.95 in both cases) but not significant according to the p-value (p-value higher than 0.05 in both cases). Beyond this specific point, the only significant evolution of p between consecutive seasons is the decrease between S3 (2016-2017) and S4 (2017-2018). The decrease is slower between S4 to S7, but still significant between these two seasons.

Evolution for AmpC

Three significant evolution of p between consecutive seasons were observed. Two decreases, the first between S3 (2016-2017) and S4 (2017-2018), the second between S4 and S5 (2018-2019). The third evolution observed is an increase between S6 (2019-2020) and S7 (2020-2021).

Evolution for AmpC-like

The only significant evolution of p between consecutive seasons is the decrease between S1 and S2 (respectively 2014-2015 and 2015-2016). After that, a significant increase is observed between S2 and S4 (2017-2018), followed by a slow decrease, significant between S4 and S7 (2020-2021).

Comparison of β -lactam resistance profiles between the *Escherichia coli* origin

The tested *E. coli* came from faeces from diarrheic calves or from necropsied calves, with two types of samples: intestinal content or internal organs. Table IV presents the results of the comparison between these two origins of *E. coli* for each resistance profile and each calving season. This analysis highlights differences in the resistance profile depending of the origin of *E. coli*. Indeed, the fecal *E. coli* present a higher rate in susceptible, NSBL and ESBL profiles. The *E. coli* isolated from necropsied calves are present in major proportion in AmpC and AmpC-like profiles.

Table IV: Results of Fisher's exact test (p-value) for each resistance profile of *Escherichia coli* depending of their origin, over seven calving season (from 2014-2015 to 2020-2021)

<i>Escherichia coli</i> from diarrheic VS necropsied calves	Resistance profiles					Global resistance
	Susceptible	NSBL	ESBL	AmpC	AmpC-like	
S1	0.09914	0.00007	0.16452	0.00856	0.68683	0.09914
S2	0.42590	0.03446	0.68770	0.06327	1.00000	0.42590
S3	1.00000	0.05172	1.00000	0.04268	0.04899	1.00000
S4	0.04960	0.03377	0.62907	0.05420	0.44391	0.04960
S5	0.18336	0.00569	0.01947	0.13785	0.84952	0.18336
S6	0.04195	0.08637	1.00000	0.63112	1.00000	0.04195
S7	0.00200	0.20700	0.28907	0.39208	0.08722	0.00200

S1: 2014-2015. S2: 2015-2016. S3: 2016-2017. S4: 2017-2018. S5: 2018-2019. S6: 2019-2020. S7: 2020-2021. NSBL: narrow-spectrum-β-lactamase. AmpC-like: NSBL with non-sensitivity to FOX. AmpC: cephalosporinase. ESBL: extended-spectrum-β-lactamase.

Comparison of β-lactam resistance profiles between the *Escherichia coli* virulotypes

The tested *E. coli* presented various virulotypes (F5, F17, CS31a or an Ehly production). Table V presents the resistance profile repartition of these various *E. coli* for all calving seasons. The analysis of each calving season considered comparatively was not pertinent, due to the very small number of isolates in some categories. Therefore, no association between virulotypes and resistance profile was significative.

Table V: Repartition of the various *Escherichia coli* virulotypes over the resistance profiles, all seven calving seasons considered together

<i>Escherichia coli</i> virulotype	Resistance profiles in %					Total
	Susceptible	NSBL	AmpC-like	AmpC	ESBL	
F5	0.2	5.8	–	0.1	0.3	6.3
F17a	3.0	12.5	1.7	1.8	2.3	21.4
CS31A	4.1	34.5	2.8	1.5	7.9	50.9
Ehly +	2.3	1.5	0.1	0.1	0.2	4.1
ND	4.0	8.6	0.9	1.4	2.4	17.3
Total	13.6	63.0	5.5	4.9	13.1	100.0

F5: *Escherichia coli* producing the fimbriae F5. F17a: *Escherichia coli* producing the fimbriae F17a. CS31a: *Escherichia coli* producing the surface antigen CS31a. Ehly+: *Escherichia coli* producing an enterohaemolysin. ND: *Escherichia coli* with not determined virulence factor. NSBL: narrow-spectrum-β-lactamase. AmpC-like: NSBL with non-sensitivity to FOX. AmpC: cephalosporinase. ESBL: extended-spectrum-β-lactamase. -: No isolate in this category.

Discussion

The observed evolutions of the resistance rates are consistent with those presented in the EFSA report, even if the origin of *E. coli* differs. Indeed, in our study, the *E. coli* were isolated from diarrheic or septiceamic calves, while in the EFSA report, they were indicative of *E. coli* collected from slaughter house [9]. Moreover, from a phenotypic point, no association between resistance and virulence may be determined. This observation should be confirm in future study, with analysis of genetic compounds of these two aspects.

Due to the royal decree [10], the number of sensitivity tests performed was more than two-fold higher during S3 than S2 (Table II). This increase in the number of tests is the first effect of the royal decree.

The second one is a decrease in the resistance to cephalosporins (ESBL, AmpC and AmpC-like resistance profiles), with different rates over the seasons. Indeed, from the royal decree implemented before S3, the ESBL profile decreases slowly (around 16% at S3 to 7.5% at S7) while the AmpC profile followed the same tendency (8% at S3 to 1% at S6), except for the last calving season, when an increase is observed. These observations may be linked to the variation in the consumption of 3rd and 4th generation cephalosporins (3GC/4GC) in livestock, even if there is a lack of data for the use of 3GC/4GC in cattle for a systemic use [16]. Concerning the AmpC-like profile, the decrease starts at S4 instead of S3. That may be explained because this profile harbours a resistance to 2nd generation cephalosporins (2GC) and not to 3GC/4GC. The regulation on their use is therefore not the main cause of this evolution.

Like for the NSBL increasing rate, this observation may be a consequence of the change in the first line treatment at the farms level. Indeed, with the regulation on the use of 3GC/4GC, the first line treatment changes, and an increasing use of the penicillins is observed, as well as for some 1GC, even if there is a global decrease in the quantity of antibiotics used [16]. That is the third effect of the royal decree.

To explain the increase of some phenotypes as well as the slow decrease of others, the most likely hypothesis is a co-selection effect. Indeed, the use of another family of antibiotics may also select a β-lactam resistance. For instance, to treat severe infection due to Gram negative bacteria in human, aminoglycosides are used frequently in combination with β-lactam, and a co-occurrence of resistance was observed [17]. The localisation of resistance-encoding genes is also an important point, especially for BLA that are most of the time encoded by plasmid-located *bla* genes. These plasmids may harbour different other resistance genes in addition to *bla* ones, like those encoding for enzymes hydrolysing aminoglycosides or for resistance to quinolones and sulphonamides [18]. That may explain that the use of other antibiotics, in the context of regulation on 3GC/4GC utilisation [10], like sulphonamides or aminoglycosides [16], may maintain the resistance to β-lactam in the bovine population [18].

Differences observed between the two origins of *E. coli*, faeces from diarrheic calves or intestinal content or organs from necropsied calves may be linked to the hypothesis that most of the time the necropsied calves were treated with antibiotics before death. The higher frequency of AmpC and AmpC-

like resistance profiles may therefore be linked, under the previous hypothesis, to the use of some β -lactam or other antibiotics with associated resistance like previously discussed. More studies will be necessary to better understand these observations.

The use of β -lactams antibiotics is widely spread and penicillins are the most used β -lactams, either in human [19] or in veterinary medicine [20]. This study confirms that compulsory regulation leading to a decrease in the use of 3GC/4GC is associated with a decrease in the associated resistances. Although beyond the scope of our study, this observation raises the question of whether this type of regulation should be applied to human medicine in the One Health context.

Conclusion

The major point of this study is the positive effect of the Royal Decree on the level of resistance to 3GC/4GC. However, some resistance profiles present an increasing rate. Therefore, it will be necessary to pursue this surveillance in the future to more precisely understand the consequences of this decree at a long term.

Acknowledgement

This work was supported by the Belgian Federal Public Service Health, Food Chain Safety and Environment [grant number RF 17/6317 RU-BLA-ESBL-CPE].

Conflict of interest

None to declare

References

- [1] Guérin V, Thiry D, Lucas P, Blanchard Y, Cawez F, Mercuri PS, et al. Identification of β -Lactamase-Encoding (*bla*) Genes in Phenotypically β -Lactam-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Young Calves in Belgium. *Microb Drug Resist*, 2021. (In press) DOI: 10.1089/mdr.2020.0472
- [2] Courvalin P, LeClercq R, Rice LB. Antibiogramme. Eska, 3rd edition, 2012, pp. 143-162 (French version).
- [3] Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 1940, 146:837
- [4] Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews*, 2010, 8:207-217

- [5] Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-Lactamase DataBase (BLDB) – Structure and Function. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32:917-919
- [6] World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva, 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- [7] World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available at : https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1. Last consulted on April 27, 2021.
- [8] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2020. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>
- [9] European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal*, 2020, 18:6007, 166 pp. DOI: [10.2903/j.efsa.2020.6007](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007)
- [10] Royal Decree of Belgium (French version). Arrêté Royal du 21 juillet 2016. Arrêté royal relatif aux conditions d'utilisation des médicaments par les médecins vétérinaires et par les responsables des animaux. Available at (in French): http://www.etaamb.be/fr/arrete-royal-du-21-juillet-2016_n2016024152.html Last consulted on April 29, 2021.
- [11] Association régionale de santé et d'identification animal (ARSIA), 2020. Antibiogrammes, rapport d'activité et résultats de l'ARSIA. Available at (French version): <https://www.arsia.be/wp-content/uploads/documents-telechargeables/RA-Antibiogrammes-2020.pdf>
- [12] DierenGezondsheidZorg” (DGZ), 2019. Antibioticaresistentie - evolutie tot eind 2019, rundvee. Available at (Dutch version): https://www.dgz.be/media/fq3lkx3z/rundvee_antibioticaresistentie_2015-2019.pdf
- [13] Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical Veterinary Microbiology, second edition, Elsevier Ltd., 2013. pp 252-255

- [14] Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 1989; 27:2559-64. doi: 10.1128/JCM.27.11.2559-2564
- [15] Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods*. 2020; 17:261-272
- [16] Belgian veterinary surveillance on antimicrobial consumption report 2019 (BELVETSAC 2019). Brussels: Federal Agency For Medicines and Health Products. Available at: https://belvetsac.ugent.be/BelvetSac_report_2019.pdf
- [17] Bodendoerfer E, Marchesi M, Imkamp F, Courvalin P, Böttger EC, Mancini S. Co-occurrence of aminoglycoside and β-lactam resistance mechanisms in aminoglycoside- non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 56:106019. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106019
- [18] Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73:1121-1137
- [19] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial consumption in the EU/EEA – Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm, 2020. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial-consumption-in-the-EU-Annual-Epidemiological-Report-2019.pdf>
- [20] World Organisation for Animal Health (OIE). OIE Annual report on the use of antimicrobial agents in animals. Paris, 2020. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Fourth_Annual_Report_AMU.pdf

Section expérimentale

Étude 2 :

Identification des gènes *bla* présents chez des *Escherichia coli*
résistants aux β -lactamines isolées de jeunes veaux en Belgique

Microb Drug Resist. 2021

Les buts de cette seconde étude étaient (1) d'identifier les gènes *bla* présents dans un échantillonnage d'*E. coli* pathogènes et non-pathogènes, selon la définition de l'ARSIA, récoltées lors de la première saison de vêlage (2017-2018) ; et (2) de comparer ces gènes avec les phénotypes observés à l'antibiogramme. Ces résultats permettront de cibler des gènes *bla* d'intérêt, à surveiller dans le contexte d'un suivi de l'évolution des résistances.

Les techniques d'analyses génétiques utilisées étaient les micro-puces à ADN (MA) (Check-points BV, Wageningen, Pays-Bas) et le séquençage complet du génome (WGS)

En résumé, les gènes détectés sont les suivants :

- ✓ *bla_{TEM}* : détecté comme *bla_{TEM-Wild-Type}* par les MA seul ou associé à d'autres gènes *bla* codant pour des BLSE ou des AmpC. Le WGS a permis d'identifier non seulement une majorité de *bla_{TEM-1}*, mais également trois variants de TEM résistants aux inhibiteurs des BLAs, *bla_{TEM-30}*, *bla_{TEM-35}* et *bla_{TEM-78}* ;
- ✓ *bla_{OXA-1}* : non ciblé par les MA, mais mis en évidence dans une majorité des souches analysées par WGS ;
- ✓ *bla_{CTX-M}* : c'est la seule famille de gènes codant pour une BLSE qui a été détectée dans les souches analysées tant par MA que par WGS. Différents variants ont été identifiés, avec une majorité appartenant au groupe CTX-M-1. Le WGS a permis l'identification précise du variant contrairement aux MA qui ne détectaient que des sous-groupes ;
- ✓ *bla_{CMY-2}* : gène codant pour une AmpC, détecté aussi bien par les MA que par le WGS ;
- ✓ *bla_{DHA-1}* : gène codant pour une AmpC, détecté aussi bien par les MA que par le WGS ;
- ✓ *bla_{ampC}* avec mutations dans le promoteur: mises en évidence par le WGS, les trois mutations détectées (en position -42, -18 et -1) entraînent, à divers niveaux, une surexpression du gène *bla_{ampC}* pouvant conduire à une résistance à certaines céphalosporines. Elles se retrouvent dans notamment presque tous les isolats avec un phénotype AmpC-like où aucun gène *bla* n'a été identifié par les MA.

Pour chacune des *E. coli* étudiées, les gènes *bla* détectés ont été mis en relation avec les phénotypes observés, et la quasi-totalité d'entre-eux permettent d'expliquer le phénotype exprimé. Cependant, 2 souches présentent encore une concordance partielle après le WGS, la présence d'autres mécanismes de résistance n'est donc pas à exclure. De plus aucune différence n'a été mise en évidence entre les souches pathogènes et non-pathogènes, selon les critères de l'ARSIA (*Cf.* Chapitre 3, points 1.1 et 1.2).

Identification of β -Lactamase-Encoding (*bla*) Genes in Phenotypically β -Lactam-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Young Calves in Belgium

Virginie Guérin,¹ Damien Thiry,¹ Pierrick Lucas,² Yannick Blanchard,² Frédéric Cawez,³ Paola Sandra Mercuri,³ Moreno Galleni,³ Marc Saulmont,⁴ and Jacques Mainil¹

The *bla* genes identification present in 94 phenotypically resistant *Escherichia coli* isolated from feces or intestinal contents of young calves with diarrhea or enteritis in Belgium was performed by microarrays (MA) and whole genome sequencing (WGS). According to their resistance phenotypes to 8 β -lactams at the disk diffusion assay these 94 *E. coli* produced a narrow-spectrum- β -lactamase (NSBL), an extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) or a cephalosporinase (AmpC). All ESBL-encoding genes identified by MA and WGS belonged to the *bla_{CTX-M}* family, with a majority to the *bla_{CTX-M-1}* subfamily. Two different genes encoding an AmpC, *bla_{CMY-2}*, and *bla_{DHA-1}* were detected in isolates with an AmpC phenotype. The *bla_{TEM-1}* and the *bla_{OXA-1}* were detected alone in isolates with a NSBL phenotype or in combination with ESBL-/AmpC-encoding *bla* genes. Furthermore, the WGS identified mutations in the *ampC* gene promoter at nucleotides -42 (C>T) and/or -18 (G>A) that could not be identified by MA, in several isolates with an AmpC-like resistance phenotype. No carbapenemase-encoding gene was detected. To our knowledge this is the first survey on the identification of *bla* genes in *E. coli* isolated from young diarrheic or septicemic calves in Belgium.

Keywords: *Escherichia coli*, calves, β -lactams resistance, microarray, whole genome sequencing, *bla* genes

Introduction

NOWADAYS, THE INCREASING spread of bacterial acquired antimicrobial resistance (AMR) in animals and humans is a major public health hazard worldwide, especially when the resistance spectrum includes hospital last resort antibiotics, such as latest generation cephalosporin and carbapenem β -lactams.¹

Already a dozen years after the penicillin discovery,² Abraham and Chain³ described the production of “an enzyme able to destroy penicillin” by *Escherichia coli*. Indeed, acquired resistance to β -lactam antibiotics in Gram-negative bacteria is most frequently mediated by the production of β -lactamase (BLA) enzymes hydrolyzing the β -lactam ring. Unfortunately the original strain of Abraham and Chain³ has been lost and the actual identity of this enzyme remains unknown, although production of a BLA_{AmpC} is the most likely hypothesis.^{4,5} The first confirmed description of a BLA_{AmpC} enzyme dates from 1973 and is produced by an *E. coli* K-12 harboring a chromosome-located *bla_{ampC}* gene.⁶ Today, it is

known that most wild-type *E. coli* possesses such a *bla_{ampC}* gene expressed at a low basal level, conferring no clinical resistance to β -lactams. However, when this gene is over-expressed, clinical resistance to all penicillins, cephemycins, first-/second-generation cephalosporins and sometimes low-level resistance to third-generation cephalosporins occur.⁷ This BLA_{AmpC} enzyme is a member of the cephalosporinase families, also generically named AmpC rendering the nomenclature confusing.⁴ Indeed, other cephalosporinase families were described during the following years (CMY, DHA, LAT, MIR, ACT, FOX) with a broad hydrolysis capacity of different β -lactams⁴ that are encoded by chromosome or plasmid genes whose expression can be induced by the presence of β -lactams.⁸ Cephalosporinase enzymes classically confer resistance to narrow and large spectrum penicillins, all four generation cephalosporins (although not always the fourth ones), cephemycins, BLA inhibitors or oxapenams and monobactams, but not to carbapenems.⁴

During the following decades, Gram-negative bacteria produce a large set of non AmpC-like BLAs displaying

¹Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, FARAH and Faculty of Veterinary Medicine, ULiège, Belgium.

²Anses Sequencing Platform, ANSES, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Ploufragan, France.

³Biological Macromolecules, Department of Life Sciences, Center for Protein Engineering (CIP), ULiège, Belgium.

⁴Regional Animal Health and Identification Association (ARSIA), Ciney, Belgium.

extended inactivation spectra of β -lactams. Today, thousands of BLAs have been described⁹ and different classifications have been proposed based on molecular and/or functional criteria.^{10,11} However, such molecular identification is not possible in routine diagnostic laboratories, especially in the veterinary field, being expensive and time consuming. The alternative is to use a phenotypic classification based on the inactivation spectra of β -lactams.

In addition to cephalosporinase families, three BLA families were described in the years 1960: BLA_{TEM}, BLA_{SHV}, and BLA_{OXA}. They confer resistance to narrow and large spectrum penicillins, to first and some second-generation cephalosporins and are encoded by acquired plasmid-located genes.⁷ In this article, they will be named “narrow-spectrum- β -lactamases” or “NSBLs.”

About 20 years later, BLAs conferring resistance to almost all penicillins, all four generation cephalosporins and monobactams but not to cephemycins, carbapenems, and oxapenams, were described for the first time and named “extended-spectrum- β -lactamases” (ESBLs).¹² Mutations in bla_{TEM}, bla_{SHV}, and bla_{OXA} genes,^{13,14} or acquisition of genes encoding other BLA families, conferring ESBL resistance phenotypes, such as VEB,¹⁵ GES,¹⁶ and CTX-M¹⁷ that are the most prevalent in human enterobacteria,¹⁸ were progressively identified. Today, more than 240 BLA_{TEM}, 235 BLA_{SHV}, and 230 BLA_{CTX-M} variants have been described,⁹ as a consequence of the accumulation of mutations in the original bla genes.

The last resort β -lactam antibiotics against AmpC- and ESBL-producing Gram-negative bacteria are the carbapenems. However, a first carbapenemase (CP) enzyme, with serine in the active site, of enterobacteria was described in 1996 produced by a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*.¹⁹ As for ESBLs, some CP derive from existing BLAs after accumulation of mutations in the encoding genes (bla_{GES-2}²⁰ or bla_{OXA-48},²¹ for instance), whereas others correspond to newly acquired chromosome- or plasmid-encoded BLAs: KPC, IMI, VIM, and most recently NDM.²² CPs can show some particularity in their β -lactam inactivation profiles (narrow and large spectrum penicillins, all cephalosporin generations, cephemycins, oxapenams, monobactams, and carbapenems), due to their action mode: serine (KPC, IMI, OXA-48) or Zn⁺⁺ (metalloenzymes such as NDM and VIM) in their active sites.²³

Several studies have widely demonstrated the primary importance of monitoring antibiotic resistance among farm animals (e.g., cattle, small ruminants, and poultry), considered as reservoir for AMR. Yet, the direct impact on human health remains unclear.²⁴

Since raising of beef cattle is most widespread in Wallonia, >90% of bacteria tested at the regional laboratory (“Association Régionale de Santé et d’Identification Animales,” ARSIA) in Wallonia²⁵ for their antibiotic resistance profiles by the disk diffusion assay (DDA) are from bovine origin and ca. 70% of them are sampled from necropsied calves and calf feces.²⁶ In Belgium, since the publication of a royal decree in summer 2016, the use of carbapenems is prohibited and the use of third- and fourth-generation cephalosporins is strictly controlled in livestock.²⁷ Consequently, a progressive decrease of ESBL-producing pathogenic *E. coli* in cattle was observed already during the 2016–2017 calving season at ARSIA. Unfortunately, no

identification of the resistance-encoding genes is routinely performed,²⁶ consequently the incidence of the different BLA families in these *E. coli* is unknown.

The purpose of this study was to (1) identify, by MA and whole genome sequencing (WGS), the different bla genes present in a set of bovine *E. coli* isolated from diarrheic and septicemic calves during the calving season 2017–2018 at ARSIA and (2) compare these bla genes with the β -lactam resistance phenotypes observed at the DDA. The results will help to develop PCRs targeting the identified bla genes to follow their evolution and to detect the emergence of other bla genes in pathogenic and commensal *E. coli* during the calving seasons in Belgium.

Materials and Methods

Bacterial isolates

A total of 94 bovine *E. coli* isolated at ARSIA (Ciney, Belgium) between November 2017 and February 2018 from feces, intestinal contents, or internal organs of <3-month-old calves suffering from diarrhea or septicemia were studied. The presence of β -lactam resistance was detected by DDA, following the EUCAST/CASFM guidelines with eight β -lactams: amoxicillin (AMX), amoxicillin + clavulanic acid (AMC), ceftiofur (XNL), cefquinome (CFQ), cefotaxime (CTX), cefotaxime + clavulanic acid (CTC), cefoxitin (FOX), and meropenem (MER).

A first group of 69 isolates, from feces, intestinal contents or internal organs, were chosen out of 433 bovine β -lactam-resistant *E. coli* to represent the NSBL, ESBL and AmpC spectra of resistance (Table 1). In this first set, isolates presenting a positive agglutination test (Biovac, Beaucozé, France) after growth on Minca agar plates (Generon, San Prospero, Italy), for fimbriae F5 or F17 or for the CS31 antigen were, therefore, considered as pathogenic. The second group comprised 25 isolates that were randomly chosen out of 435 fecal or intestinal *E. coli* growing on MacConkey agar plates containing 1 mg/L of cefotaxime (McC-CTX) (Led Techno, Lienden, The Netherlands), selective for ESBL-, AmpC-, and CP-production, using the “RANDBETWEEN” function of Excel® (Table 1). This second set contained *E. coli* with negative agglutination test, therefore classified as nonpathogenic. To avoid as much as possible clonal relationship between the isolates, one isolate per calf and herd was chosen.

Since no bovine CP-producing *E. coli* was isolated, six CP-positive strains isolated from human were added as controls for the MA: 2 *E. coli* harboring the bla_{NDM-1} or bla_{OXA-48} genes, 2 *K. pneumoniae* harboring the bla_{KPC-3} or bla_{VIM-4} genes and 2 *Pseudomonas aeruginosa* harboring the bla_{VIM-2} or bla_{NDM-1} genes (kindly provided by Professor Y. Glupczynski, CHU Mont-Godinne, Catholic University of Louvain, Belgium).

Microarrays

The DNA of the 94 bovine *E. coli* and of the 6 CP-positive strains was extracted with the DNeasy Blood and Tissue kit® (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and stored at -20°C. Tests were performed by Check-Points BV (Wageningen, The Netherlands), following the MA protocol previously described.²⁸ The different bla genes and families

IDENTIFICATION OF *BLA* GENES

3

TABLE 1. CLASSIFICATION OF RESISTANCE BASED ON THE PROFILE OBSERVED AT THE DISK DIFFUSION ASSAY IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM YOUNG DIARRHEIC OR SEPTICEMIC CALVES

Resistance profiles	Antibiotics								No. of isolates		
	AMX	AMC	XNL	CFQ	CTX	CTC	FOX	MER	Set1	Set2	Total
AmpC	R	R	R	R	R	R	R	S	8	3	11
AmpC-like	R	R	S	S	S	S	I/R	S	6	12	18
NSBL	R	S/I/R	S	S	S	S	S	S	15	1	16
ESBL	R	S/I	R	R	R	S/I	S	S	33	6	39
ESBL + NSBL	R	R	R	R	R	S/I	S	S	3	2	5
ESBL + AmpC-like	R	R	R	R	R	S/I	I/R	S	4	1	5
CP	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	0

R, resistant; I, intermediate; S, sensitive; AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin + clavulanic acid; XNL, ceftiofur; CFQ, cefquinome; CTX, cefotaxime; CTC, cefotaxime + clavulanic acid; FOX, cefoxitin; MER, meropenem; AmpC, cephalosporinase; NSBL, narrow-spectrum-β-lactamase; ESBL, extended-spectrum-β-lactamase; CP, carbapenemase; Set1, *Escherichia coli* isolates chosen for their resistance profile and their pathogenic classification; Set2, *E. coli* isolates randomly chosen for their growth on MacConkey-Cefotaxime selective agar plates and their nonpathogenic classification.

that the Check-MDR CT-103XL® microarrays kit (Check-Points BV, Wageningen, The Netherlands) can detect are listed in Table 2.

Whole genome sequencing

The genome of 29 isolates with discrepancy between the DDA and the MA results were sequenced as well as 15 isolates with matching DDA-MA results as controls. Sequencing was performed using NovaSeq 6000 Illumina technology (paired-end sequencing; Nextera XT DNA Sample Prep Kit, Illumina) by the Brain and Spine Institute (ICM Institute). Reads were cleaned and assembled with the shovill method (v1.0.4; <https://github.com/tseemann/shovill>), with a minimum length of 200 bp and a minimum coverage of 2. Contigs were analyzed with ResFinder-3.1²⁹ to detect mutations and resistance genes and annotated with the RAST tool kit in PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center).³⁰

Results*Identification of bla genes by MA and comparison of MA and DDA results*

The following bla genes were detected in the 94 bovine *E. coli* isolates (Table 3): bla_{TEM-WT} in 67 isolates; bla_{CTX-M-1}, bla_{CTX-M-2}, and/or bla_{CTX-M-9} in 50 isolates; and bla_{CMY-2} or bla_{DHA-1} in 6 isolates. The bla_{TEM-WT} genes were detected

alone in 22 isolates and in association with bla_{CTX-M} or with bla_{CMY-2}/bla_{DHA-1} genes in 40 and 5 isolates, respectively, whereas the bla_{CTX-M} genes were detected alone in 10 isolates. Four of the 5 bla_{CMY-2} and the bla_{DHA-1} genes were detected in association with bla_{TEM-WT} genes, whereas the remaining isolate was positive for the bla_{CMY-2} gene alone. No CP-encoding genes were detected in the bovine isolates, but the expected ones were detected in the six CP-positive control bacteria.

The comparison of the MA and DDA results yields the following conclusions (Table 3): (1) a perfect match was observed for 61 isolates, that is, the detected genes are in agreement with the phenotypes. Nevertheless, for 30 of them, presenting an ESBL phenotype, additional genes were detected; (2) a partial match was observed for 12 isolates, that is, the detected genes were not in total agreement with the phenotype; (3) no match was observed for 5 isolates, that is, the detected genes were in total disagreement with the phenotypes; and (4) no gene was detected in 16 isolates, including 13 with an AmpC-like phenotype.

Detected genes were similar between the two sets of isolates, regardless of their origins (feces, intestinal contents, or organs) (Table 1).

Identification of bla genes by WGS and comparison with the DDA results

All genomic data related to this study are available through the NCBI BioProject PRJNA566319.

Forty-three isolates were genome sequenced: 16 isolates with no gene detected by the MA, 5 isolates with no MA-DDA matching results, 4 isolates with partial matching results, 3 isolates with matching results and additional genes detected, and 15 isolates with matching results, as controls (Table 4).

The 16 isolates with no gene detected with the MA harbored the bla_{ampC} gene with 2 or 3 mutations in the promoter (14 isolates), the OXA-1-encoding gene (5 isolates) and/or the TEM-IB-encoding gene (1 isolate) (Table 4). The mutations in the promoter of the bla_{ampC} gene and the bla_{OXA-1} gene cannot be detected by the MA (Table 2). The WGS of the remaining 27 isolates not only confirmed the presence of the genes detected by MA although the TEM-encoding genes were different from bla_{TEM-1/2} in three

TABLE 2. TARGETED FAMILIES OF *BLA* GENES BY THE CHECK-MDR CT103XL MICROARRAY KIT

Family	bla genes
NSBL	TEM-WT; SHV-WT
ESBL	BEL; CTX-M (Groups 1 ^a , 2, 9, and 8/25); GES-ESBL; PER; SHV-ESBL; TEM-ESBL; VEB
AmpC	ACC; ACT; CMY; DHA; FOX; MIR; MOX
CP	GES-Carba; GIM; IMP; KPC; NDM; OXA (groups 23-, 24-, 48-, and 58-like); SPM; VIM

^aGroup 1 contains subgroup types 1-, 3-, 15-, and 32-like. Adapted from https://check-pointshealth.com/wp-content/uploads/2018/11/Check-MDR_CT103XL_IFU_10-0023_EN-v1.1-20170918.pdf

AmpC, cephalosporinases; CP, carbapenemases.

TABLE 3. DISK DIFFUSION ASSAYS PHENOTYPES AND GENES INVOLVED IN β -LACTAM RESISTANCE DETECTED BY MICROARRAYS IN 94 BOVINE *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES

<i>DDA phenotype</i>	<i>Detected bla genes by MA coding for</i>	<i>No. of isolates</i>	<i>MA-DDA matching</i>
AmpC (AMC^R)	CMY-2	1	Yes
	CMY-2 + TEM-WT	4	Yes
	CTX-M-1 + TEM-WT	1	No
	TEM-WT	4	No
AmpC-like (AMC^R)	TEM-WT	5	Partial
	DHA + TEM-WT	1	Partial
	None	13	—
NSBL ($AMC^{S/I/R}$)	TEM-WT	13	Yes
	None	3	—
ESBL ($AMC^{S/I}$)	CTX-M-1 (type 1-like)	1	Yes
	CTX-M-1 (type 32-like)	4	Yes
	CTX-M-2	3	Yes
	CTX-M-9	1	Yes
	CTX-M-1 (type 1-like) + TEM-WT	8	Yes +
	CTX-M-1 (type 15-like) + TEM-WT	6	Yes +
	CTX-M-1 (type 32-like) + TEM-WT	5	Yes +
	CTX-M-1 (type 32-like) + CTX-M-2 + TEM-WT	1	Yes +
	CTX-M-2 + TEM-WT	6	Yes +
	CTX-M-9 + TEM-WT	4	Yes +
ESBL + NSBL (AMC^R)	CTX-M-1 (type 15-like)	1	Partial
	CTX-M-1 (type 1-like) + TEM-WT	1	Yes
	CTX-M-2 + TEM-WT	1	Yes
	CTX-M-9 + TEM-WT	2	Yes
ESBL + AmpC-like (AMC^R)	CTX-M-1 (type 15-like) + TEM-WT	2	Partial
	CTX-M-1 (type 32-like) + TEM-WT	1	Partial
	CTX-M-9 + TEM-WT	2	Partial

AMC, amoxicillin + clavulanic acid; R, resistant; I, intermediate; S, sensitive; AmpC, cephalosporinase; YES, matching results between DDA and MA (the detected genes explaining the observed phenotypes); YES +, matching results with additional genes detected by MA (some of the detected genes explain the observed phenotypes); PARTIAL, partially matching results between DDA and MA (the detected genes do not fully explain the observed phenotypes); NO, no matching results between DDA and MA/WGS (the detected genes do not explain the observed phenotypes); —, no gene. DDA, disk diffusion assay; MA, microarrays; WGS, whole genome sequencing.

isolates (*bla_{TEM-30}*, *bla_{TEM-35}*, and *bla_{TEM-78}*), but also identified the presence of the *bla_{ampC}* gene with mutations in the promoter and/or of the *bla_{OXA-1}* gene in 14 of them.

A perfect match (yes and yes+ categories in Tables 3 and 4) was observed between the WGS and DDA results for 41 of the 43 genome-sequenced isolates versus only 18 of these 43 isolates for the MA and DDA results. In particular, 15 of the 16 AmpC-like isolates (Table 4) harbored a *bla_{ampC}* gene with 3 mutations in the promoter explaining this phenotype. The two isolates with partial matching between WGS and DDA results were one AmpC-like isolate harboring TEM-1B- and DHA-1-encoding genes and one ESBL+AmpC-like in which the *bla_{ampC}* gene carried only two mutations in the promoter (Table 4).

Of the 27 genome-sequenced isolates with genes detected by MA (Table 4), the results of the WGS matched the results of MA for 24 isolates, with additional genes detected by WGS for 13 of them and partially matched for the 3 isolates harboring the *bla_{TEM-30}*, *bla_{TEM-35}*, or *bla_{TEM-78}* genes and also mutations in the promoter of the *bla_{ampC}* gene in two of them.

As for the DDA-MA comparison, the detected genes were similar in the two sets of isolates.

Discussion

Since the existing classifications of the BLA enzymes^{10,11} cannot easily be applied in veterinary routine diagnostic laboratories in Belgium, the prevalence of the different BLA

families and *bla* genes in bovine *E. coli* in Belgium is unknown. The purpose of this study was, therefore, to identify the *bla* genes present in *E. coli* isolated from young calves with diarrhea, enteritis, and/or septicemia during the 2017–2018 calving season with different resistance phenotypes to eight β -lactams at the DDA (Table 1). The results will help to develop appropriate PCR assays for future studies aiming at following the incidence of the *bla* genes over the years and at comparing bovine *E. coli* with human *E. coli*, focusing more especially on those with ESBL and AmpC resistance profiles.

E. coli isolates belonging to the ESBL, ESBL+NSBL, and ESBL+AmpC-like resistance phenotypes harbor gene(s) of the *bla_{CTX-M}* family, mostly the *bla_{CTX-M-1}* and less frequently the *bla_{CTX-M-2}* or *bla_{CTX-M-9}* genes, which explain the ESBL resistance profile (Table 3 and 4). Such results are similar to those of *E. coli* in livestock especially cattle in Europe, with the *bla_{CTX-M-1}* and *bla_{CTX-M-9}* genes being the most frequent ESBL-encoding gene, compared with the *bla_{CTX-M-2}* gene.^{18,31–33} In several of the same isolates, other genes are detected whose presence, either cannot be suspected according to the DDA results (ESBL phenotype) or add resistance to other β -lactams, especially to oxapenams or to cephamycins (ESBL+NSBL and ESBL+AmpC-like phenotypes; Table 1): *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXA-1}*, and/or *bla_{ampC}* with two mutations in the promoter (n-18 G>A and n-1 C>T) (Tables 3 and 4).

The results of the isolates belonging to the AmpC and AmpC-like phenotypes are more heterogeneous. At first, a

IDENTIFICATION OF *bla* GENES

5

TABLE 4. DETECTED GENES INVOLVED IN β -LACTAM RESISTANCE AFTER WHOLE GENOME SEQUENCING OF 43 ISOLATES WITH DIFFERENT DISK DIFFUSION ASSAYS AND MICROARRAYS MATCHING RESULTS

<i>MA-DDA matching</i>	<i>DDA phenotype</i>	<i>Detected bla genes by MA coding for</i>	<i>Detected bla genes by WGS coding for</i>	<i>No. of isolates</i>	<i>WGS-DDA matching</i>
—	AmpC-like (AMC ^R)	None	MutAmpC (-1, -18, -42) MutAmpC (-1, -18, -42) + OXA-1 MutAmpC (-1, -18, -42) + TEM-1B OXA-1 OXA-1 + MutAmpC (-1, -18)	10 2 1 2 1	Yes
	NSBL (AMC ^{S/I/R})	None	CTX-M-1 + TEM-35 MutAmpC (-1, -18, -42) + TEM-1A + OXA-1	1 4	Yes
No	AmpC (AMC ^R)	CTX-M-1 + TEM-WT TEM-WT	CTX-M-14 + TEM-1B + MutAmpC (-1, -18)	1	
Partial	AmpC-like (AMC ^R)	TEM-WT	MutAmpC (-1, -18, -42) + TEM-1A + OXA-1 MutAmpC (-1, -18, -42) + TEM-30	1 1	Yes
	ESBL + AmpC-like (AMC ^R)	DHA + TEM-WT CTX-M-9 + TEM-WT	DHA + TEM-1B CTX-M-14 + TEM-1B + MutAmpC (-1, -18)	1 1	Partial
Yes +	ESBL (AMC ^{S/I})	CTX-M-1 (type 1-like) + TEM-WT CTX-M-1 (type 15-like) + TEM-WT	CTX-M-1 + TEM-1B CTX-M-1 + TEM-1B + OXA-1 CTX-M-156 ^a + TEM-1B + OXA-1	1 1 1	Partial Yes +
Yes	AmpC (AMC ^R)	CMY-2 + TEM-WT	CMY-2 + TEM-1A CMY-2 + TEM-1B	2 1	Yes
	NSBL (AMC ^{S/I/R})	TEM-WT	TEM-1A + OXA-1 TEM-1B TEM-1B + OXA-1 TEM-1B + MutAmpC (-1, -18)	1 4 1 1	Yes
	ESBL (AMC ^{S/I})	CTX-M-1 (type 32-like) CTX-M-2	CTX-M-32 CTX-M-2	1 2	Yes
	ESBL + NSBL (AMC ^R)	CTX-M-1 (type 1-like) + TEM-WT CTX-M-2 + TEM-WT	CTX-M-1 + TEM-1B + MutAmpC (-1, -18) CTX-M-2 + TEM-78 + MutAmpC (-1, -18)	1 1	Yes +

AMC, amoxicillin + clavulanic acid; R, resistant; I, intermediate; S, sensitive; AmpC, cephalosporinase; YES, matching results between DDA and MA/WGS (the detected genes explaining the observed phenotypes); YES +, matching results with additional genes detected by MA/WGS (some of the detected genes explain the observed phenotypes); PARTIAL, partially matching results between DDA and MA/WGS (the detected genes do not fully explain the observed phenotypes); NO, no matching results between DDA and MA/WGS (the detected genes do not explain the observed phenotypes); —, no gene detected by MA; MutAmpC, *ampC* gene with two or three mutations detected in the promoter, concerned position in bracket.

^aCTX-M 156 is a member of the CTX-M-1 group in the type 15-like subgroup.

majority of AmpC and AmpC-like isolates, without DDA-MA matching, harbor a *bla_{ampC}* gene with 3 mutations in the promoter (n-42 C>T, n-18 G>A and n-1 C>T) (Tables 3 and 4). Chromosome-located *bla_{ampC}* genes are usually expressed at a very low level and do not confer clinical resistance to β -lactams.⁷ However the accumulation of mutations in their promoter may increase the gene expression and confer resistance to several β -lactams, but still not to latest generation cephalosporins and carbapenems.³⁴⁻³⁶

These resistance phenotypes can, therefore, be confused with the NSBL phenotype in routine analysis (Table 1). The level of mRNA transcription was not measured, but the production of a BLA with the Diatabs test (Rosco, via International Medical Product, Brussels, Belgium) showed the hydrolysis of the ampicillin for 16 of these 19 isolates (data not shown). The increase of the *bla_{ampC}* gene expression is, therefore, the most likely explanation. Nevertheless, alternative explanations of the resistance to cephamycins exist: mutation within the genes coding for the penicillin-binding proteins, production of efflux pumps and/or a modification of the membrane permeability.³⁷ For instance, the resistance to cephamycins of the five ESBL+

AmpC-like isolates may have similar alternative explanations,⁴ since (1) the two sequenced isolates harbor only two mutations in the *bla_{ampC}* gene promoter (n-18 and n-1) and (2) the same two mutations in two NSBL isolates and in two ESBL+NSBL isolates have no apparent consequence on their sensitivity to cephamycins. More isolates with (ESBL+) AmpC and AmpC-like resistance profiles should be genetically studied to more precisely understand the resistance profile and the actual role of the mutated *bla_{ampC}* gene.

In addition, other genes of the AmpC family are present that can explain the AmpC and AmpC-like phenotypes: the *bla_{CMY-2}* gene in five AmpC isolates and the *bla_{DHA-1}* gene in one AmpC-like isolate (Tables 3 and 4).^{4,8} In Europe, the *bla_{CMY-2}* gene is also frequent in livestock.^{18,31-33} Finally the remaining AmpC isolate harbors a *bla_{CTX-M-1}* gene and a *bla_{TEM-35}* gene, which is an oxapenam-resistant variant and can, therefore, also explain the resistance to oxapenams,³⁷ in contrast to ESBL+NSBL isolates harboring *bla_{CTX-M}* and *bla_{TEM-WT}* genes (Tables 1, 3, and 4).

As for the isolates belonging to the NSBL phenotype, either or both *bla_{TEM-1B}* and *bla_{OXA-1}* genes were detected. In addition, as discussed earlier, one *bla_{ampC}* gene with two

mutations in the promoter was also identified in two of the genome-sequenced NSBL isolates along with the *bla_{TEM-1B}* and *bla_{OXA-1}* genes (Tables 3 and 4), but with no consequence on the resistance phenotype. Very importantly, no bovine *E. coli* belong to the CP phenotype and no CP-encoding gene could be identified, neither by MA nor by WGS.

The comparison between the different resistance profiles observed at DDA of bovine *E. coli* isolates with their *bla* gene contents detected by MA and/or WGS was the second objective of this study. The results of the MA and DDA perfectly match (yes and yes+ categories in Table 3) for 61 of the 94 isolates studied. In addition, *bla* genes and/or mutations that could not be detected by the MA, such as the *bla_{OXA-1}* gene and the *bla_{ampC}* gene with mutations in the promoter, were detected in the genome-sequenced of 29 of the 33 isolates with no perfect match between MA and DDA. Therefore, after WGS, only 2 of these genome-sequenced 29 isolates still have partial match between genetic and phenotypic results. MA and DDA mismatch results in this study are, therefore, explained by the presence of untargeted *bla* genes such as the *bla_{OXA-1}* gene and of untargeted mutations in some *bla* genes, such as in the promoter of the *bla_{ampC}* gene. In contrast to these results on bovine *E. coli*, the MA kit Check-MDR CT103XL® correctly detected several *bla* genes (Table 2) of different *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, and *Acinetobacter* species.^{39,40} However, the probes of the MA were chosen according to the prevalence of the *bla* genes in humans and not in animals. Moreover, in those previous studies, the targeted *bla* genes were known before the MA test.

Conclusion

As a conclusion, the detected *bla* genes are in accordance with the different resistance phenotypes of the bovine *E. coli* in Belgium (Tables 1, 3, and 4) and with the *bla* genes contents of the bovine *E. coli* in other European countries.^{18,31–33} Moreover, no difference was observed between intestinal and septicemic isolates, pathogenic or not. Therefore, the PCR for the *bla_{TEM-1/2}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-9}*, and *bla_{CMY-2}* genes represent, currently, the most useful tools to follow the incidence of the most frequent *bla* genes identified in cattle from Belgium. Further studies are necessary to follow the evolution of the β-lactams resistance and to estimate the impact of the antibiotics use regulation, to have a better control of AmpC-/ESBL-producing *E. coli* in cattle.

Acknowledgments

The authors thank Professor Y. Glupscynski for providing the CP-positive bacterial strains isolates used as controls in this study, and the technicians from bacteriology laboratory of ARSIA for their technical help. The authors are also grateful to the ICM institute for its technical support in NovaSeq NGS sequencing. The authors thank Jean-Noël Duprez for his help in the realization of DDA and DNA extraction. The authors thank Check-Point for their excellent welcome in their laboratory, their detailed explanations, and their technical support during the MA tests. These results were presented, in part, during the 30th World Buiatrics Congress (Sapporo, Japan, August 2018) and during the 8th Symposium on Antimicrobial Resistance in

Animals and the Environment (Tours, France, July 2019). The authors are grateful to two anonymous reviewers for their comments and suggestions that helped improved this article.

Authors' Contributions

V.G. performed the MA assay, analyzed the antibiotic sensitivity results and the genome sequences, and wrote the article. D.T. supervised the whole study, discussed and helped to analyze the phenotypic and genetic results, and wrote parts of the article. M.S. supervised the whole study, isolated and identified the bovine *E. coli*, performed the antibiotic sensitivity assay, and discussed the results. M.G. and J.M. supervised the whole study, discussed the results, and synthesized the different parts of the article. P.L. and Y.B. performed the genome sequencing and wrote parts of the article. F.C. and P.S.M. discussed the phenotypic and genetic results, and helped to write parts of the article.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This study was supported by the Belgian Federal Public Service Health, Food Chain Safety and Environment [Grant No. RF 17/6317 RU-BLA-ESBL-CPE].

References

- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018. Stemming the Superbug Tide: Just A Few Dollars More, OECD Health Policy Studies. OECD Publication, Paris.
- Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. Br. J. Exp. Pathol. 10:226–236.
- Abraham, E.P., E. Chain. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 3713:837.
- Jacoby, G.A. 2009. AmpC B-lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 22:161–182.
- Frère J.-M., E. Sauvage, and F. Kerff. 2016. From “An enzyme able to destroy penicillin” to carbapenemases: 70 years of beta-lactamase misbehavior. Curr. Drug Targets 17:974–982.
- Burman, L., J. Park, B. Lindström, and H. Boman. 1973. Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins: identification of the structural gene for the chromosomal penicillinase. J. Bacteriol. 116:123–130.
- Livermore, D. 1995. β-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8:557–584.
- Pham, J.N., I. Chambers, L. Poirel, P. Nordmann, and S.M. Bell. 2010. Detection of a plasmid-mediated inducible cephalosporinase DHA-1 from *Escherichia coli*. Pathology 42:196–197.
- Naas, T., S. Oueslati, R.A. Bonnin, et al. 2017. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 32:917–919.
- Ambler, R.P. 1980. The structure of beta-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 289:321–331.
- Bush, K., and G.A. Jacoby. 2010. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 54:969–976.
- Ghafourian, S., N. Sadeghfard, S. Soheili, and Z. Sekawi. 2015. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. Curr. Issues Mol. Biol. 17:11–22.

IDENTIFICATION OF *bla* GENES

7

13. Kliebe, C., B.A. Nies, J.F. Meyer, R.M. Tolxdorff-Neutzling, and B. Wiedemann. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:302–307.
14. Paul, G.C., G. Gerbraud, A. Bure, A.M. Philippon, B. Pangon, and P. Courvalin. 1989. TEM-4, a new plasmid-mediated β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1958–1963.
15. Poirel, L., T. Naas, M. Guibert, E.B. Chaibi, R. Labia, and P. Nordmann. 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:573–581.
16. Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordmann. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:622–632.
17. Nordmann, P., and H. Mammeri. 2007. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.* 2:297–307.
18. Ewers, C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther, and L.H. Wieler. 2012. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 646–655.
19. Yigit, H., A.M. Queenan, G.J. Anderson, et al. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1151–1161.
20. Poirel, L., G.F. Weldhagen, T. Naas, C. De Champs, M.G. Dove, and P. Nordmann. 2001. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2598–2603.
21. Poirel, L., C. Héritier, V. Tolün, and P. Nordmann. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:15–22.
22. Lauretti, L., M.L. Riccio, A. Mazzariol, et al. 1999. Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3589–3596.
23. Nordmann, P. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med. Mal. Infect.* 44:51–56.
24. Madec, J.-Y., M. Haenni, P. Nordmann, et al. 2017. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? *Clin. Microbiol. Infect.* 23:826–833.
25. Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA). 2018. Annual report (French version), 11–13. Available at <https://www.arsia.be/wp-content/uploads/documents-telechargeables/RA-2018-web.pdf>, (accessed February 7, 2021).
26. Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA). 2019. Annual report (French version), 14. Available at <https://www.arsia.be/wp-content/uploads/documents-telechargeables/RA-2019-web.pdf>, (accessed February 7, 2021).
27. Royal Decree of Belgium (French version). Moniteur Belge. 07-21-2016 updated 12-09-2020. Available at [www.ejustice.just.fgov.be/eli/arrete/2016/07/21/2016024152/justel](http://ejustice.just.fgov.be/eli/arrete/2016/07/21/2016024152/justel), (accessed February 7, 2021).
28. Cohen Stuart, J., C. Dierikx, N. Al Naiemi, et al. 2010. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1377–1381.
29. Zankari, E., H. Hasman, S. Cosentino, et al. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2640–2644.
30. Brettin, T., J.J. Davis, T. Disz, et al. 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* 5:8365.
31. Gonggrijp, M.A., I.M.G.A. Santman-Berends, A.E. Heuvelink, et al. 2016. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing *Escherichia coli* in dairy farms. *J. Dairy Sci.* 99:9001–9013.
32. Michael, G.B., H. Kaspar, A.K. Siqueira, et al. 2017. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008–2014. *Vet. Microbiol.* 200:142–150.
33. Ghosh, K.K., L.A. Lebert, S.A. McEwen, et al. 2019. Extended-spectrum β -lactamase and ampC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens raised in small flocks in Ontario, Canada. *Microb. Drug Resist.* 25:1250–1256.
34. Caroff, N., E. Espaze, D. Gautreau, H. Richet, and A. Reynaud. 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:783–788.
35. Mulvey, M.R., E. Bryce, D.A. Boyd, et al. 2005. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 358–365.
36. Tracz, D.M., D.A. Boyd, R. Hizon, et al. 2007. ampC gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 265–271.
37. Hamed, R.B., J.R. Gomez-Castellanos, L. Henry, C. Ducho, M.A. McDonough, and C.J. Schofield. 2013. The enzymes of β -lactam biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 30:21–107.
38. Cantón, R., M.I. Morosini, O. Martin, S. De La Maza, and E.G.G. De La Pedrosa. 2008. IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1:53–62.
39. Cunningham, S.A., S. Vasoo, and R. Patel. 2016. Evaluation of the check-points check MDR CT103 and CT103 XL microarray kits by use of preparatory rapid cell lysis. *J. Clin. Microbiol.* 54:1368–1371.
40. Powell, E.A., D. Haslam, and J.E. Mortensen. 2017. Performance of the check-points check-MDR CT103XL assay utilizing the CDC/FDA antimicrobial resistance isolate bank. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 88:219–221.

Address correspondence to:
Virginie Guérin, DVM
Bacteriology
Department of Infectious and Parasitic Diseases
FARAH and Faculty of Veterinary Medicine
4000 Liège
Belgium

E-mail: vguerin@uliege.be

Section expérimentale

Étude 3 :

Détection par PCR triplex des groupes CTX-M chez *Escherichia coli* isolées de veaux en Wallonie

Suite aux résultats obtenus dans l'étude 2, l'objectif de cette troisième étude est double : (i) étudier l'évolution des groupes CTX-M sur 3 saisons de vêlage chez les *E. coli* pathogènes, et (ii) la comparer avec celle des *E. coli* non-pathogènes pour la même période. Une PCR triplex adaptée de Pitout *et al* (2004) et d'Ogutu *et al* (2015) permettra d'identifier la présence de gènes *bla_{CTX-M}* appartenant aux groupes CTX-M-1, CTX-M-2 et CTX-M-9 dans les *E. coli* de bovins présentant un phénotype BLSE à l'antibiogramme. Les résultats obtenus seront comparés entre *E. coli* pathogènes et non-pathogènes, selon les critères de l'ARSIA précédemment décrits (*Cf.* Chapitre 3, points 1.1 et 1.2).

Au total sur les trois saisons, tous types d'*E. coli* confondus, le groupe CTX-M-1 est majoritaire, avec un total de 243 isolats positifs (61,68%), tandis que les groupes CTX-M-2 et CTX-M-9 présentent respectivement 64 (16,24%) et 74 (18,78%) isolats positifs. Certains isolats présentaient deux groupes CTX-M : CTX-M-1 et CTX-M-2 pour un total de six isolats, et CTX-M-2 associé à CTX-M-9 pour un seul isolat. La PCR n'a pas permis de mettre en évidence un groupe CTX-M pour six isolats, ceux-ci ont donc été séquencés.

Les analyses statistiques ne montrent cependant pas d'évolution significative entre les groupes CTX-M détectés lorsque les *E. coli* pathogènes et non-pathogènes sont considérés séparément. Ce résultat peut être une conséquence des nombres relativement faibles d'isolats dans chaque catégorie par rapport au total. Lorsque toutes les *E. coli* sont considérées ensemble, des différences significatives sont observées pour les groupes CTX-M-1 et CTX-M-9. Ainsi, une « inversion » entre les groupes CTX-M-1 et CTX-M-9 semble bien avoir lieu pour la deuxième saison de vêlage, puisqu'une diminution de prévalence y est observée pour CTX-M-1 tandis qu'une augmentation est présente pour CTX-M-9.

De plus, les résultats permettent de corroborer le rôle de réservoir de résistance des bactéries commensales, puisque dans cette étude, aucune différence n'a pu être observée dans le contenu des gènes *bla_{CTX-M}* entre les *E. coli* pathogènes et non-pathogènes, ces derniers représentant même une proportion légèrement supérieure par rapport au nombre total d'isolats testés.

Ces résultats sont intéressants, et il serait utile de poursuivre les études des gènes *bla_{CTX-M}* afin d'obtenir une meilleure compréhension des résistances de type BLSE dans le futur.

L'article concernant cette étude est soumis pour publication.

Article soumis pour publication**Three years evolution and comparison of the *bla_{CTX-M}* genes in pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* isolated from young diarrheic and septicaemic calves in Belgium**

Virginie Guérin^{a*}, Damien Thiry^a, Alban Farchi^b, Frédéric Cawez^c, Paola Mercuri^c, Pierrick Lucas^d, Yannick Blanchard^d, Marc Saulmont^e, Jacques Mainil^a

a. Bacteriology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, FARAH and Faculty of Veterinary Medicine, ULiège, Belgium

b. CREA, École des Ponts, EDF R&D, IPSL, Marne-la-Vallée, France

c. Biological Macromolecules, Department of Life Sciences, Center for Protein Engineering (CIP), ULiège, Belgium, ULiège, Belgium

d. Anses sequencing platform, ANSES, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Ploufragan, France

e. Regional Animal Health and Identification Association (ARSIA), Ciney, Belgium

vguerin@uliege.be : Correspondence and reprints

Damien.Thiry@uliege.be

alban.farchi@enpc.fr

Frederic.Cawez@uliege.be

pmercuri@uliege.be

pierrick.lucas@anses.fr

Yannick.BLANCHARD@anses.fr

marc.saulmont@arsia.be

jg.mainil@uliege.be

Abstract

Escherichia coli producing Extended-Spectrum- β -Lactamases (ESBL) are a major public health hazard worldwide. The most common ESBL belong to the CTX-M family. This study follows their prevalence in pathogenic and non-pathogenic ESBL-producing *E. coli* isolated from young diarrheic and septicaemic calves over three calving seasons. The triplex PCR targeted three main groups: CTX-M-1, CTX-M-2 and CTX-M-9. Of the 394 isolates studied, 388 were positive, with a majority (243) of CTX-M-1, following by CTX-M-9 (74) and CTX-M-2 (64) groups. The absence of statistically significant difference in the CTX-M content between pathogenic and non-pathogenic *E. coli* is a major point of this study.

Keywords : CTX-M ; ESBL ; livestock

1. Introduction

Escherichia coli producing Extended-Spectrum- β -Lactamases (ESBL) are a major public health hazard worldwide [1]. According to the European Union monitoring, the average rate of resistance to third-generation cephalosporins, like cefotaxime, in human invasive *E. coli* (isolated from blood or cerebrospinal fluid) is around 15%, with a higher proportion in the southern than in the northern European countries [2]. In farm animals (poultry, pig and bovine), the resistance rate to third-generation cephalosporins for indicator *E. coli* (isolated in caecal samples from slaughterhouse) is lower than in humans, with a median rate at 1.2%, excepted for Belgium and Lithuania where this rate is higher (>14%). These resistance rates were ranged from 0.6% to 6.3% in pigs isolates, from 0.6% to 7.9% in broilers isolates and from 1.2% to 5.3% in calf isolates. In Belgium, this resistance rate has been increasing in fattening pig and broilers, but decreasing in young calves between 2009 and 2017 [3]. Unfortunately, the genetic background involved in this evolution is unknown.

However, the most common ESBL as much in humans than in animals belong to the CTX-M family [4]. This family comprises more than 200 variants [5], which have several clonal relationships and are therefore classified in four main groups: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 and CTX-M-8/25 [6-8]. The CTX-M-1 group comprises more than 100 *bla*_{CTX-M} genes (<http://blldb.eu/alignment.php?align=A:CTX-M-1-like>) and is the most frequent worldwide in humans, especially with the *bla*_{CTX-M-15} gene, and in livestock with the *bla*_{CTX-M-1} gene [9]. The CTX-M-2 and CTX-M-9 groups, represented most of the time by the *bla*_{CTX-M-14} gene, are also relatively frequent in humans and in livestock [9] and contain respectively more than 30 (<http://blldb.eu/alignment.php?align=A:CTX-M-2-like>) and 70 (<http://blldb.eu/alignment.php?align=A:CTX-M-9-like>) *bla*_{CTX-M} genes. Conversely, the prevalence of CTX-M-8/25 group is low, as well in humans than in animals [9], but this group contains also the smallest number of *bla*_{CTX-M} genes, less than 20 (<http://blldb.eu/alignment.php?align=A:CTX-M-8-like>). According to a recent study using microarrays and whole genome sequencing, the *bla*_{CTX-M} genes are found most frequently in *E. coli* with an ESBL resistance profile isolated from young diarrheic and septicaemic calves in Belgium [10].

The purpose of this study was therefore two-fold: (i) to follow the frequency and evolution of the most frequent groups of *bla*_{CTX-M} genes in pathogenic *E. coli* isolated from young calves in Belgium during three calving seasons from 2017 to 2020; (ii) to compare these results with those obtained in non-pathogenic *E. coli* also isolated from young calves.

2. Material and Methods

2.1 Pathogenic *E. coli* isolates

Pathogenic *E. coli* were isolated during three calving seasons (S1 to S3), between 2017-2018 and 2019-2020, as part of the routine procedure at the veterinary regional diagnostic laboratory of Wallonia, Belgium (“Association Régionale de Santé et d’Identification Animales”, ARSIA). They came either from faeces of diarrheic calves or from intestinal contents and organs of necropsied calves.

Pathogenic *E. coli* from faeces or intestinal contents were isolated on the basis of a positive agglutination test (Biovac, Beaucozé, France) for fimbriae F5 and/or F17a (of enterotoxigenic *E. coli*) or for the CS31a surface antigen and/or the production of a haemolysin on blood agar plates (of putative septicaemic *E. coli*) and the production of an enterohaemolysin on washed sheep blood agar plates (of enteropathogenic and Shigatoxigenic *E. coli*) [11, 12]. *E. coli* isolated from organs growing as pure culture on the Gassner agar plates were considered as pathogenic. All positive isolates were tested by the disk diffusion assay (DDA) against 8 β-lactams to identify their β-lactam resistance profiles as previously described [10].

2.2 Non-pathogenic *E. coli* isolates

Non-pathogenic *E. coli* were collected in parallel of pathogenic isolates, from same calves, by growing faeces or intestinal contents on MacConkey agar plates containing 1mg/L of Cefotaxime (Led Techno, Lienden, The Netherlands). They tested negative for the production of fimbriae F5 and F17a, of CS31a surface antigen and (entero)haemolysin. DDA were then performed as previously described [10].

2.3 Multiplex PCR for the bla_{CTX-M} genes

All pathogenic and non-pathogenic *E. coli* with an ESBL resistance profile were tested with a triplex PCR for the CTX-M-1, CTX-M-2 and CTX-M-9 groups of bla_{CTX-M} genes. The DNA extraction was performed by heating 1 ml of an overnight culture in LB broth at 100°C during 10 min. The fastgen hotstart (nippon genetic, from filter service, Eupen, Belgium) was used with a PCR protocol slightly adapted from Pitout *et al.* [13], using the primers targeting CTX-M-2 group (GCGACCTGGTTAACTACAATCC and CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC), and Ogutu *et al.* [14], using the primers targeting CTX-M-1 (TTAGGAAGTGTGCCGCTGTA and CGGTTTATCCCCACAAC) and CTX-M-9 (GGTGATGAACGCTTCCAAT and TTATCACCTGCAGTCCACGA) groups. PCR conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 10 min, 30 cycles of a denaturation step at 94°C for 30 sec, an annealing at 62.5°C for 35 sec, and an extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 9 min and by cooling at 7°C. The amplified fragments were visualized after an electrophoresis in a 1.5% agarose gel.

The positive control was a mix of the DNA from 3 *E. coli* strains SAMN12785819; SAMN12779887; SAMN12785825 [10] harbouring respectively the bla_{CTX-M-1}, bla_{CTX-M-2} and bla_{CTX-M-14} genes, the last one representing the CTX-M-9 group, and the negative control was the DH5-α *E.coli*.

2.4 Whole Genome Sequencing (WGS)

The genome of the PCR negative isolates were sequenced, as well as two PCR positive isolates with two CTX-M groups detected. Sequencing was performed using NovaSeq 6000 Illumina technology (paired-end sequencing; Nextera XT DNA Sample Prep Kit, Illumina) by the Brain and Spine Institute (ICM Institute). Reads were cleaned and assembled with the shovill method (v1.0.4; <https://github.com/tseemann/shovill>), with a minimum length of 200 bp and a minimum coverage of 2. Contigs were analyzed with ResFinder and PointFinder databases (version: 2020-10-23) [15] to detect mutations and resistance genes.

2.5 Statistical analysis

The evolution of the proportion p of isolates harbouring a specific group of bla_{CTX-M} genes was followed during three calving seasons: 2017-2018 (S1), 2018-2019 (S2) and 2019-2020 (S3).

First, each detected CTX-M group, both in pathogenic and non-pathogenic *E. coli*, was analysed independently. The theoretical proportion p was treated as a random variable, with an uniform priori probability density function (PDF). Each individual test was a Bernoulli trial and hence the likelihood of observing a specific proportion p was given by the Binomial distribution. Bayes' theorem was used to compute the a posteriori PDF of p for each season and to obtain several estimates such as the 95% confidence interval. The evolution of p over the three seasons was then examined using a one-sided Fisher's exact test and was considered significant if the p-value was lower than 0.05.

Finally, the pathogenic and non-pathogenic *E. coli* were compared, for each CTX-M group and each season, using a two-sided Fisher's exact test. The two categories were considered significantly different if the p-value was lower than 0.05.

The entire statistical analysis was performed using Python 3, in particular scipy's [16] implementation of Fisher's exact test.

3. Results

3.1 Triplex PCR

The triplex PCR detected bla_{CTX-M} genes in 388 of the 394 isolates studied (Table 1). Most of them (243/394) were positive to the CTX-M-1 group. The CTX-M-2 group was detected in 64 isolates, and the CTX-M-9 group in 74 isolates. The genes encoding the CTX-M-1 and CTX-M-2 groups or the CTX-M-2 and CTX-M-9 groups were simultaneously detected respectively in six and one isolates. Finally, six isolates tested negative to all three CTX-M groups. They were therefore analysed by WGS (Bioproject PRJNA732800), but no bla_{CTX-M} gene could be identified. The bla_{TEM-52} , an ESBL-encoding gene was detected in two strains. For the four others, no bla gene was detected.

3.2 Statistical analysis/Calving season evolution

The evolution of the proportion p of isolates positive to the CTX-M-1, CTX-M-2, and CTX-M-9 groups over the three calving seasons (S1 to S3) and the results of Fisher's exact test (the p-value) are reported in (Fig.1) and (Table 2), respectively.

The proportion of CTX-M-1-positive isolates was lower in S2 than in S1 and S3, while the proportion of CTX-M-9-positive isolates was higher in S2 than in S1 and S3 (Fig.1). This evolution was present in both pathogenic and non-pathogenic isolates. However, considering either pathogenic or non-pathogenic isolates, neither evolution was statistically significant (Table 2). Nevertheless, considering the pathogenic and non-pathogenic isolates together, the evolution of the CTX-M-1-positive proportion between the S1 and S2 and between S2 and S3 seasons as well as the increase in CTX-M-9-positive proportion between S1 and S2 were statistically significant, contrary to the decrease in CTX-M-9-positive proportion between S2 and S3.

Finally, the results of the Fisher's exact test performed to compare pathogenic and non-pathogenic isolates in each CTX-M group over the 3 calving seasons showed no statistically significant difference (Table 2).

4. Discussion

This study has implemented a PCR-based monitoring during three calving seasons to follow different groups of *bla_{CTX-M}* genes in bovine *E. coli*. At first, the genomic analysis confirms that this triplex PCR represents a valuable identification tool of *bla_{CTX-M}* genes as already described [17-19]. Indeed, the groups of *bla_{CTX-M}* genes detected by the triplex PCR are in agreement with the *bla_{CTX-M}* genes identified previously in 10 isolates whole genome sequenced [10].

Concerning the evolution of the three CTX-M groups over the three calving seasons, the evolution of neither the CTX-M-1, nor the CTX-M-9 were statistically significant, after independent analysis of pathogenic and non-pathogenic *E. coli* (Fig. 1a and 1b). These results may be due to the relatively small number of ESBL isolates in both categories per season. Conversely, the statistical analysis was significant in a global context (Fig. 1c), i.e. when pathogenic and non-pathogenic isolates were considered together. In this context, the shift between the prevalence of CTX-M-1 and CTX-M-9 from the first to the second calving season was statistically significant. Nevertheless, it is not possible to conclude to a global evolution of *bla_{CTX-M}* genes in ESBL bovine *E. coli* since the evolution from the second to the third calving season was not significant. Further studies with a higher number of ESBL-producing *E. coli* over more calving seasons will be necessary to understand more deeply the evolution of *bla_{CTX-M}* genes in bovine *E. coli*.

The second major point of this study is that no statistically significant difference was observed in the *bla_{CTX-M}* genes content between pathogenic and non-pathogenic *E. coli* over the three calving seasons. The commensal and pathogenic *E. coli* were collected in parallel, from the same faecal or organ samples. To our knowledge, this methodology is rare and the focus is more on either pathogenic or

commensal *E. coli* more frequently sampled at slaughterhouses, rendering the comparison difficult. Due to the high proportion of non-pathogenic isolates, with the same origin than pathogenic one, the absence of statistical difference between these two categories suggests that commensal bacteria represent an AMR-reservoir [4].

4.1 Conclusion

The monitoring of the genetic element beside the ESBL phenotype is highly important in a One Health context [20], and the triplex PCR used in this study represents an useful, reliable and cheap tool to analyse a high number of isolates to monitor the ESBL resistance in the future, not only in humans but also in animals. To go further in the analysis of CTX-M families and to compare the *bla_{CTX-M}* gene variants present in livestock and humans, it would be pertinent to sequence the PCR amplified fragments or the whole genome of the ESBL isolates.

Conflict of interest

None to declare

Acknowledgements

The authors thank Jean-Noël Duprez for his technical support in DDA and PCR. The authors are also grateful to the ICM institute for its technical support in NovaSeq NGS sequencing. This work was supported by the Belgian Federal Public Service Health, Food Chain Safety and Environment [grant number RF 17/6317 RU-BLA-ESBL-CPE].

References

- [1] Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, WHO, 2017. Available at : https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1. Last consulted on April 07, 2021.
- [2] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm: ECDC; 2020
- [3] EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2020. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. EFSA Journal 2020;18:6007, 166 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>
- [4] Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, et al. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics* 2017; 6:12. doi: 10.3390/antibiotics6020012.
- [5] Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-Lactamase DataBase (BLDB) – Structure and Function. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32:917-919
- [6] Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72:2145-2155
- [7] Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β-lactamase (ESBL). *Med Mal Infect* 2014; 44:400-4
- [8] D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 2013; 303:305-17
- [9] Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:646-55
- [10] Guérin V, Thiry D, Lucas P, Blanchard Y, Cawez F, Mercuri PS, et al. Identification of β-Lactamase-Encoding (*bla*) Genes in Phenotypically β-Lactam-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Young Calves in Belgium. *Microb Drug Resist* 2021. In press. DOI: 10.1089/mdr.2020.0472
- [11] Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D, Clinical Veterinary Microbiology, second ed., Elsevier Ltd., 2013.
- [12] Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2559-64
- [13] Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5715-21
- [14] Ongut JO, Zhang Q, Huang Y, Yan H, Su L, Gao B, et al. Development of a multiplex PCR system and its application in detection of *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}* and *bla_{OXA-1}* group genes in clinical *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *J Antibiot (Tokyo)* 2015; 68:725-33

- [15] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 10. PMID: 22782487 doi: 10.1093/jac/dks261
- [16] Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods.* 2020; 17:261-272
- [17] Afema JA, Ahmed S, Besser TE, Jones LP, Sischo WM, Davis MA. Molecular Epidemiology of Dairy Cattle-Associated *Escherichia coli* Carrying *bla*_{CTX-M} Genes in Washington State. *Appl Environ Microbiol* 2018; 84:e02430-17
- [18] Seo KW, Lee YJ. The occurrence of CTX-M-producing *E. coli* in the broiler parent stock in Korea. *Poult Sci.* 202; 100:1008-1015
- [19] Elmonir W, Shalaan S, Tahoun A, Mahmoud SF, Remela EMA, Eissa R, et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and genotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods of cattle origin, diarrheic cattle, and diarrheic humans in Egypt. *Gut Pathog* 2021; 13:8. doi: 10.1186/s13099-021-00402-y.
- [20] Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2016; 110:377-80

Tables

Table 1: Repartition of the *Escherichia coli* with an ESBL phenotype at the disk diffusion assay in CTX-M-groups detected by the triplex PCR isolated from Belgian calves during three calving seasons (from 2017-2018 to 2019-2020)

Calving season	S1 (%)			S2 (%)			S3 (%)			Total: S1+S2+S3 (%)		
	P	NP	All	P	NP	All	P	NP	All	P	NP	All
<i>bla</i> _{CTX-M} groups targeted												
CTX-M-1	37 (9,4)	63 (16,0)	100 (25,4)	37 (9,4)	47 (11,9)	84 (21,3)	26 (6,6)	33 (8,4)	59 (15,0)	100 (25,4)	143 (36,3)	243 (61,7)
CTX-M-2	9 (2,3)	17 (4,3)	26 (6,6)	10 (2,5)	14 (3,6)	24 (6,1)	7 (1,8)	7 (1,8)	14 (3,6)	26 (6,6)	38 (9,6)	64 (16,2)
CTX-M-9	10 (2,5)	13 (3,3)	23 (5,8)	19 (4,8)	18 (4,6)	37 (9,4)	7 (1,8)	7 (1,8)	14 (3,6)	36 (9,1)	38 (9,6)	74 (18,8)
CTX-M-1 + CTX-M-2	0 (1,0)	4 (1,0)	4 (1,0)	0 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	0 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	5 (1,3)	6 (1,5)
CTX-M-2 + CTX-M-9	0 (0,8)	0 (0,8)	0 (0,8)	0 (0,5)	0 (0,5)	0 (0,8)	1 (0,3)	0 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,3)	0 (1,3)	1 (1,5)
Negative	0 (0,8)	3 (0,8)	3 (0,8)	1 (0,3)	2 (0,5)	3 (0,8)	0 (0,8)	0 (0,8)	0 (0,8)	1 (0,3)	5 (1,3)	6 (1,5)
Total of isolates	56 (14,2)	100 (25,4)	156 (39,6)	67 (17,0)	82 (20,8)	149 (37,8)	42 (10,7)	49 (12,4)	89 (22,6)	165 (41,9)	228 (57,9)	394 (100,0)

P: Pathogenic *E. coli*. NP: Non-pathogenic *E. coli*. All: Pathogenic and non-pathogenic *E. coli*. S1: 2017-2018. S2: 2018-2019. S3: 2019-2020

Table 2: For each CTX-M group and each comparison, results of Fisher's exact test (the p-value) and of the Bayesian inversion (the probability)

<i>bla</i> _{CTX-M} groups targeted	Season comparison	p-value			<i>E. coli</i> type comparison	p-value		
		P	NP	All		S1	S2	S3
CTX-M-1	S1 > S2	0.09616	0.13050	<u>0.03122</u>	P // NP	1.00000	0.62586	0.50484
	S2 < S3	0.18303	0.08368	<u>0.03956</u>				
CTX-M-2	S1 > S2	0.51667	0.37997	0.32211	P // NP	0.52820	0.66195	0.41733
	S2 < S3	0.24587	0.37883	0.47547				
CTX-M-9	S1 < S2	0.13245	0.08686	<u>0.02202</u>	P // NP	0.48522	0.45047	0.58158
	S2 > S3	0.21821	0.20797	0.09848				

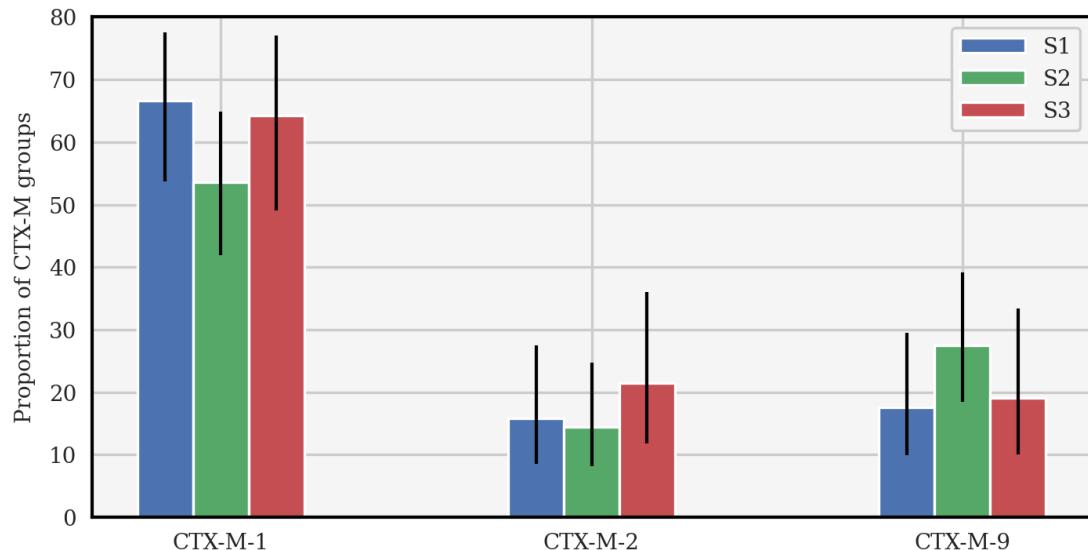
S1: 2017-2018 calving season. S2: 2018-2019 calving season. S3: 2019-2020 calving season. P: Pathogenic *E. coli*. NP: Non-pathogenic *E. coli*. All: Pathogenic and non-pathogenic *E. coli*. “S1 < S2” means that the tested hypothesis is whether p is higher during the second season than during the first. The significant evolutions are highlighted in bold and underlined.

Figures

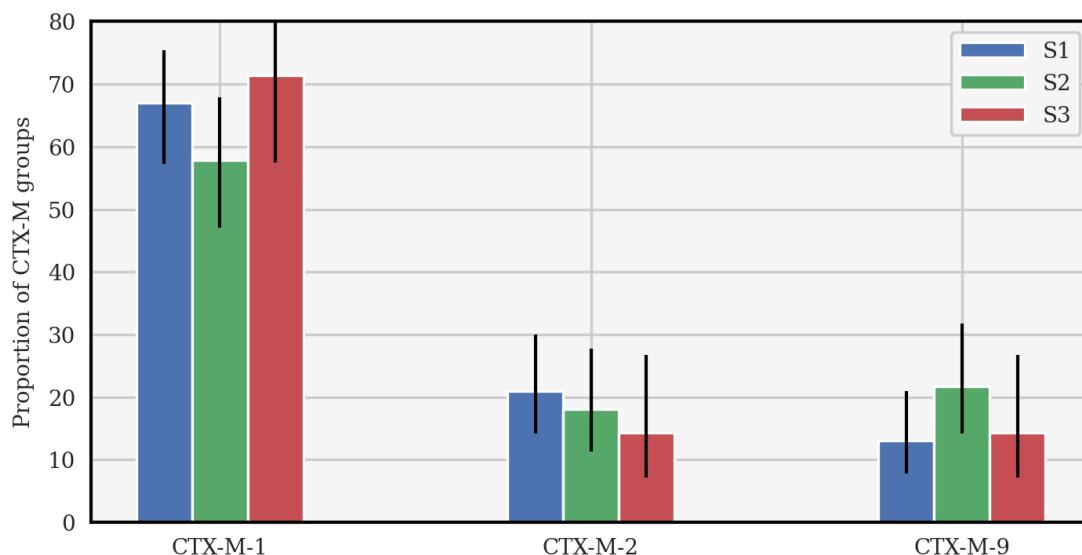
Figure 1: Proportions of *Escherichia coli* isolates in each CTX-M-targeted-groups with the triplex PCR for each calving season (from 2017-2018 to 2019-2020)

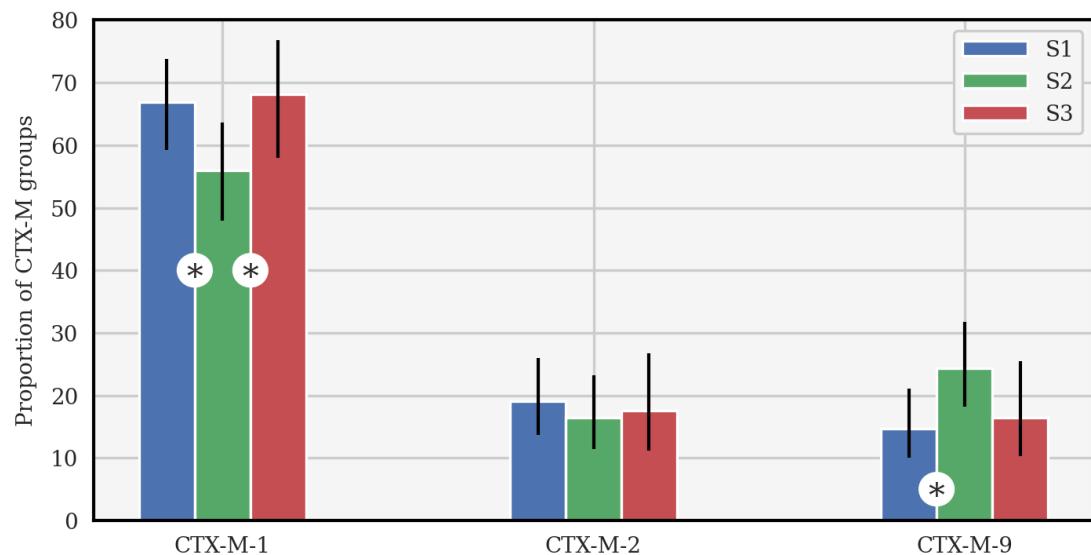
S1: calving season 2017-2018. S2: Calving season 2018-2019. S3: Calving season 2019-2020. In each case, the histogram shows the proportion and the black line shows the 95% confidence interval. Asterisk shows the statistically significant evolution between seasons ($p < 0.05$).

1a. pathogenic *E. coli* only



1b. non-pathogenic *E. coli* only



1c. both pathogenic and non-pathogenic isolates

Section expérimentale

Étude 4 :

Séquençage d'*Escherichia coli* isolées de veaux en Wallonie

Cette étude a été réalisée sur 522 souches d'*E. coli* réparties sur les trois saisons de vêlage, présentant des phénotypes BLSE, AmpC ou AmpC-like à l'antibiogramme. L'analyse par séquençage complet du génome (WGS) de ces souches a permis d'étudier la diversité génétique présente, ainsi que la mise en évidence des gènes de résistance.

Les résultats montrent une grande diversité dans les types séquentiels (ST pour *sequence types*) identifiés. Le ST majoritaire est le ST88, avec 174/522 souches, suivi de loin par le ST10, avec 56/522 souches. Lorsque les complexes clonaux (CC), c'est-à-dire l'ensemble des ST proches d'un point de vue phylogénétique, sont considérés, ces deux groupes restent prédominants, avec plus de la moitié des souches. Ainsi, le CC23 (ST88 et associés) comporte 210 souches et le CC10 (ST10 et associés) en comporte 124. Ces deux ST (10 et 88) sont importants car ils sont prédominants, mais également parce que les souches y étant classées possèdent quasi toutes une ou plusieurs mutation(s) dans le promoteur du gène *bla_{ampC}*, connue(s) pour entraîner la surexpression de ce dernier. De plus, ces mutations sont rarement associées à un gène codant pour une BLSE. Les autres ST répertoriés dans les 522 souches présentent rarement une de ces mutations, mais plus fréquemment des gènes codant pour une BLSE. Une analyse plus approfondie de ces résultats dépasse le cadre de ce travail, mais sera réalisée pour une publication en préparation.

Les phylogroupes détectés *in silico* sont les suivants : A, B1, C, D, E, F et G. Pour deux souches, le phylogroupe n'a pas pu être déterminé. Tandis que les groupes A et C sont majoritaires, avec respectivement 156 et 208 souches, aucune souche n'appartient au groupe B2.

Un autre point important est le taux très élevé de souches multi-résistantes, c'est-à-dire avec des gènes de résistance pour au moins 3 familles différentes d'antibiotiques, soit deux supplémentaires à la résistance aux β-lactamines commune à l'ensemble des souches analysées. En effet, seules six souches ne sont pas concernées par la multi-résistance, sur base des gènes de résistance détectés.

L'article concernant cette étude est en préparation.

1. Introduction

Suite aux résultats précédemment obtenus (*Cf.* études 1 à 3) et dans l'objectif d'une meilleure compréhension des résistances aux β -lactamines médiées par les enzymes BLAs, une analyse par WGS a été réalisée sur un ensemble d'*E. coli* isolées de veaux diarrhéiques ou septicémiques sur trois saisons de vêlage consécutives (de 2017-2018 à 2019-2020).

L'objectif principal de cette étude est d'analyser d'un point de vue spatio-temporel les résistances aux β -lactamines chez les *E. coli* isolées de veaux diarrhéiques ou septicémiques. Pour ce faire, le contenu en gènes *bla* sera analysé, mais également les relations clonales existantes entre les différentes souches d'*E. coli* isolées durant 3 saisons de vêlage successives, ainsi que la répartition géographique des souches analysées.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Échantillons

2.1.1 *Escherichia coli*

La sélection des isolats d'*E. coli* parmi l'ensemble de la collection s'est fait sur plusieurs critères successifs, afin d'arriver à un total de 522 isolats. Il a été choisi de ne garder que les isolats provenant d'élevages situés en Belgique (certains échantillons de la collection provenant du Grand-Duché de Luxembourg ou du nord de la France), et d'essayer au maximum d'avoir plusieurs *E. coli* d'un même troupeau, réparties sur les 3 saisons de vêlage. De plus, il a été décidé d'étudier en priorité les résistances de types BLSE, AmpC et AmpC-like. Ensuite, pour poursuivre la comparaison des *E. coli* pathogènes et non-pathogènes (*Cf.* études 2 et 3), ces derniers étant en majorité isolés par la sélection sur le milieu McC-CTX (*Cf.* Chapitre 3, point 1.1), les isolats *E. coli* non-pathogènes uniques représentants de leurs troupeaux ont été supprimés. Cela a été fait en gardant l'objectif d'une étude spatio-temporelle, donc les isolats « isolés » géographiquement ont été conservés, ainsi que ceux collectés lors de la dernière saison de vêlage (2019-2020) puisqu'elle comportait un nombre total d'isolats plus faible que les deux autres.

2.1.2 Extraction de l'ADN

Les *E. coli* choisies ont été mises en croissance *overnight* à 36 +/- 1 °C dans 5ml de milieu liquide de type LB contenant 5 μ L d'ampicilline à 100mg/ml, afin d'avoir une concentration finale en ampicilline de 100 μ g/ml. L'ampicilline a été ajoutée au milieu pour favoriser la conservation des résistances présentes. Après quoi, l'ADN a été extrait avec le *Blood and Tissue kit* de Qiagen (Benelux).

2.1.3 Préparation des librairies pour le séquençage

Les banques ont été préparées en utilisant les ADN précédemment extraits, avec le NEBNext Ultra II FS DNA library prep kit (Illumina) en suivant les recommandations du fournisseur mais en divisant par deux tous les volumes. Une taille moyenne de 350pb a été utilisée pour les fragments d'ADN. Après la

réalisation de ces librairies, les échantillons ont été quantifiés et mélangés de manière équimoléculaire pour former le *pool* puis dénaturés avant d'être séquencés.

2.2 Séquençage complet du génome

Le séquençage a été effectué avec un séquenceur NextSeq500 d'Illumina, en paired-end de 2x 75 pb. Après 18h de séquençage, les données obtenues ont été démultiplexées pour obtenir les *reads*. La couverture moyenne de l'ensemble des 522 isolats est de 210, avec des extrêmes de 100 et 476. Cette couverture moyenne a été calculée pour chaque génome en divisant la sommes des tailles des fichiers fastq non compressés (obtenus par le démultiplexage) par la taille des fichiers fasta (obtenus par l'assemblage. Cf. point suivant). Pour tous les échantillons, la couverture est bonne, avec l'ensemble des régions couvertes au moins 20 fois.

2.2.1 Assemblage

L'assemblage des *reads* en *contigs* a été réalisé avec le programme Spades (version 3.15.0), ce qui a permis d'obtenir les fichier fasta. Les *contigs* inférieurs à 500 paires de bases ont également été filtrés avant la réalisation de l'analyse phylogénétique par ParSNP (version 1.2), mais conservés pour les recherches de gènes de résistance (Cf. point suivant).

2.2.2 Analyses bio-informatiques

Plusieurs analyses ont été réalisées, pour répondre aux différents objectifs.

Ainsi, l'analyse du MLST a été réalisée avec le programme du même nom (version 2.19.0), et a permis de déterminer les ST présents dans les souches étudiées.

L'analyse des phylogroupes a été réalisée via la méthode *in silico* de Clermont (Beghain *et al.*, 2018), avec ezclermontyping dans bioconda (environnement informatique). Cette analyse cible 4 gènes types, et en fonction des combinaisons obtenues, un phylogroupe est déterminé.

La phylogénie a été réalisée avec ParSNP (version 1.2) en choisissant au hasard l'un des génomes en tant que référence. Le fichier ainsi obtenu a été chargé sur iTOL (version 6 ; <https://itol.embl.de/>) pour leur visualisation et les légendes ont été faites à partir des tableaux de résultats des analyses et des données pour chaque souche.

La recherche des gènes et mutations de résistances a été réalisée avec ResFinder (version du 23/10/2020) (Bortolaia *et al.*, 2020) et PointFinder (version du 26/01/2020) (Zankari *et al.*, 2017). La recherche des facteurs de virulence a été effectuée avec VirulenceFinder (version 2.0 du 29/05/2020), dans la base de données d'*E. coli* (Malberg Tetzschner *et al.*, 2020 ; Joensen *et al.*, 2014), tandis que la recherche des sérogroupes a été réalisée avec SerotypeFinder (version 1.0.0 du 24/09/2020) (Joensen *et al.*, 2015). L'ensemble de ces analyses a été fait localement, via abricate, un logiciel sur le cluster de l'Institut Pasteur, où les bases de données avaient été téléchargées.

De plus, une répartition des *E. coli* analysées sur la carte de la Belgique a été effectuée sur base des coordonnées géographiques approximatives, en utilisant datawrapper (<https://www.datawrapper.de/>).

3. Résultats

3.1 Répartition des souches

Les souches analysées ont été localisées sur la carte de la Belgique (Figure 1a), également disponible en version interactive (<https://datawrapper.dwcdn.net/j53Uc/4/>). Les souches ont été réparties selon leur saison de collecte, ce qui permet de voir que la répartition est relativement homogène. Cette répartition concorde avec la densité des élevages bovins en Wallonie (Figure 1b).

3.2 Diversité des Escherichia coli

Les résultats de l'analyse du MLST mettent en avant une grande diversité des *E. coli* bovins. En effet, 64 ST différents ont été détectés, bien que certains ne comportent qu'une seule souche. Les 11 ST comportant plus de 10 souches sont détaillés dans le tableau I, tandis que les 53 ST représentés par moins de 10 souches sont regroupés dans une catégorie « autres ». Celle-ci comporte également quatre souches, seules représentantes de leur ST qui n'est pas déterminé avec certitude. Pour six souches le ST reste indéterminé.

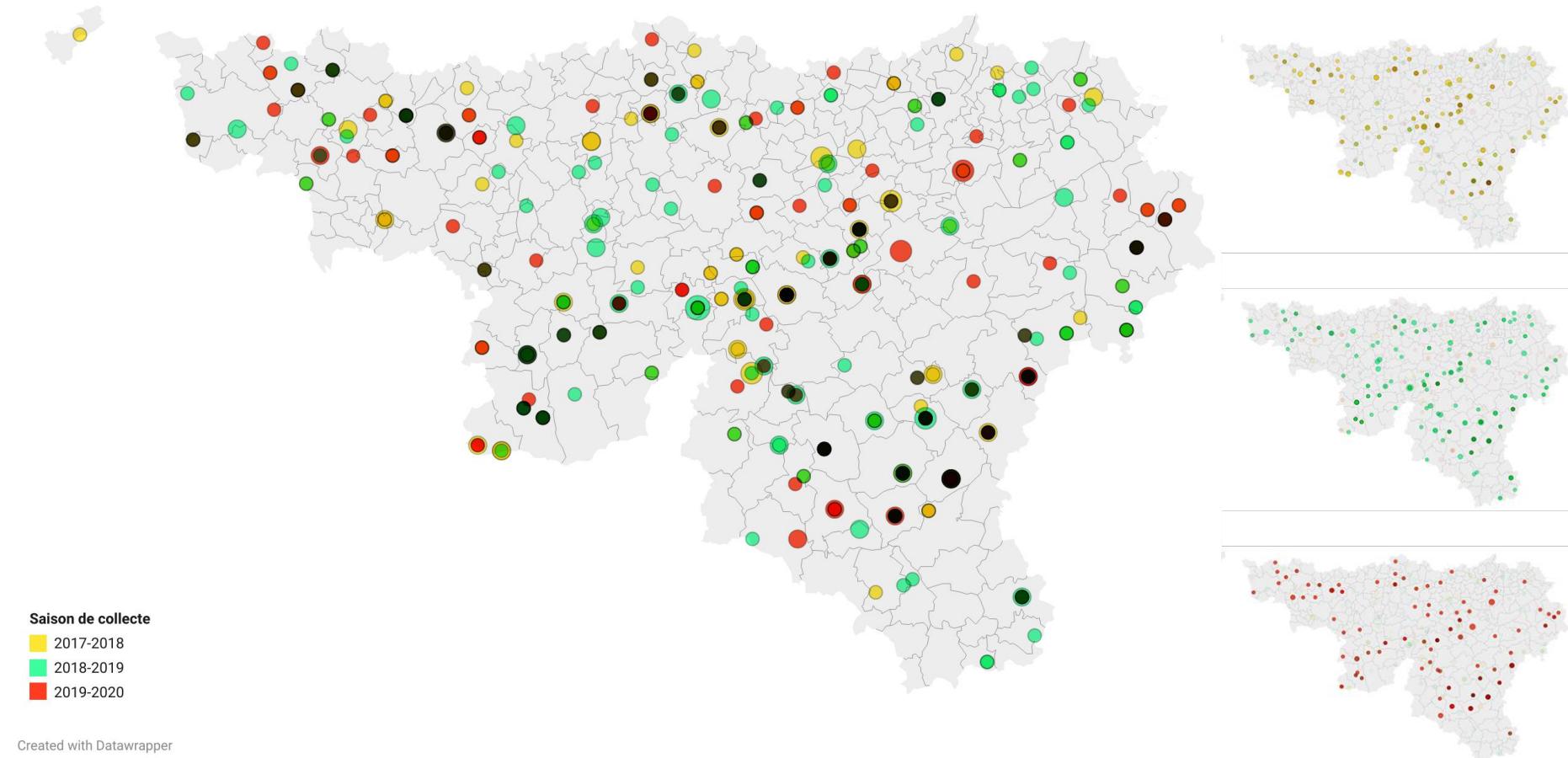
Ces ST majoritaires ont été localisés sur la carte de la Belgique (Figure 2), celle-ci est également disponible en version interactive (<https://datawrapper.dwcdn.net/ZocXi/1/>). Cela permet de voir que la localisation des différents ST est variée. Malgré quelques localisations comportant plus de souches d'un même ST (cercles plus grands), des analyses supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer si cela représente des foyers d'*E. coli* porteuses de résistance.

Les phylogroupes majoritaires sont le groupe A avec 156 souches et le groupe C avec 208 souches. Les phylogroupes B1, D, E, F et G ont également été détectés en moindre proportion, dans respectivement 62, 40, 12, 12 et 30 souches. Pour deux souches, le phylogroupe n'a pu être déterminé.

L'arbre phylogénétique obtenu par la phylogénie réalisée avec ParSNP est présenté dans la figure 3. Il comporte l'ensemble des 522 souches, les phylogroupes, les ST et les familles d'antibiotiques pour lesquelles au moins un gène ou une mutation de résistance a été détectée.

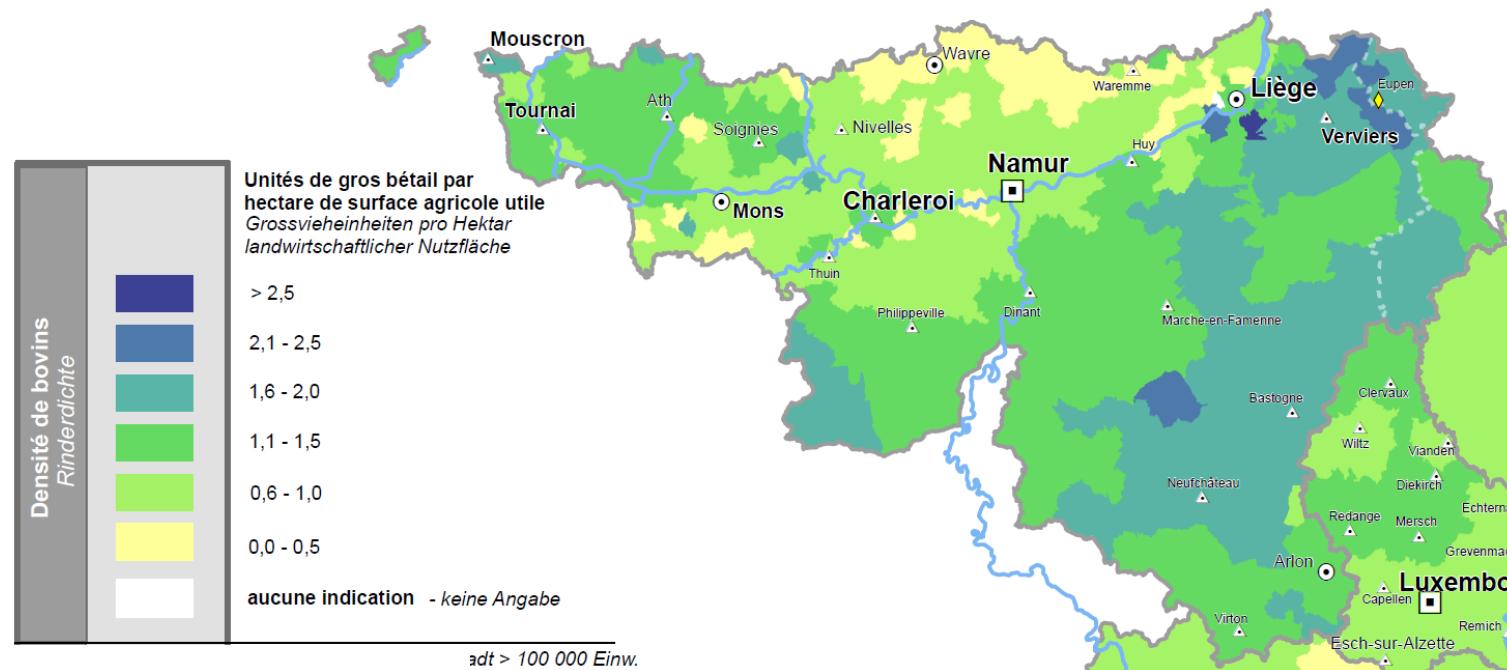
Figure 1 : Répartition géographique des 522 *Escherichia coli* isolées de veaux diarrhéiques ou septicémiques en Wallonie et analysées par séquençage complet du génome selon leur saison de vêlage (de 2017-2018 à 2019-2020) (1a) et densité de la population bovine par surface agricole utile en Wallonie (1b)

1a



Lorsqu'il y a des souches de plus d'une année pour une localisation, les couleurs se superposent donnant par exemple les points noirs. La taille du cercle est proportionnelle au nombre de souches. Une version interactive de cette carte est disponible à l'adresse suivante <https://datawrapper.dwcdn.net/j53Uc/4/>.

1b



Source de l'image : EuroGeographics EuroRegional Map v9.1 - 2016; Groupe de travail "Agriculture et forêt" de la Grande Région. Auteurs : SIG-GR Réalisation : 01.2018.

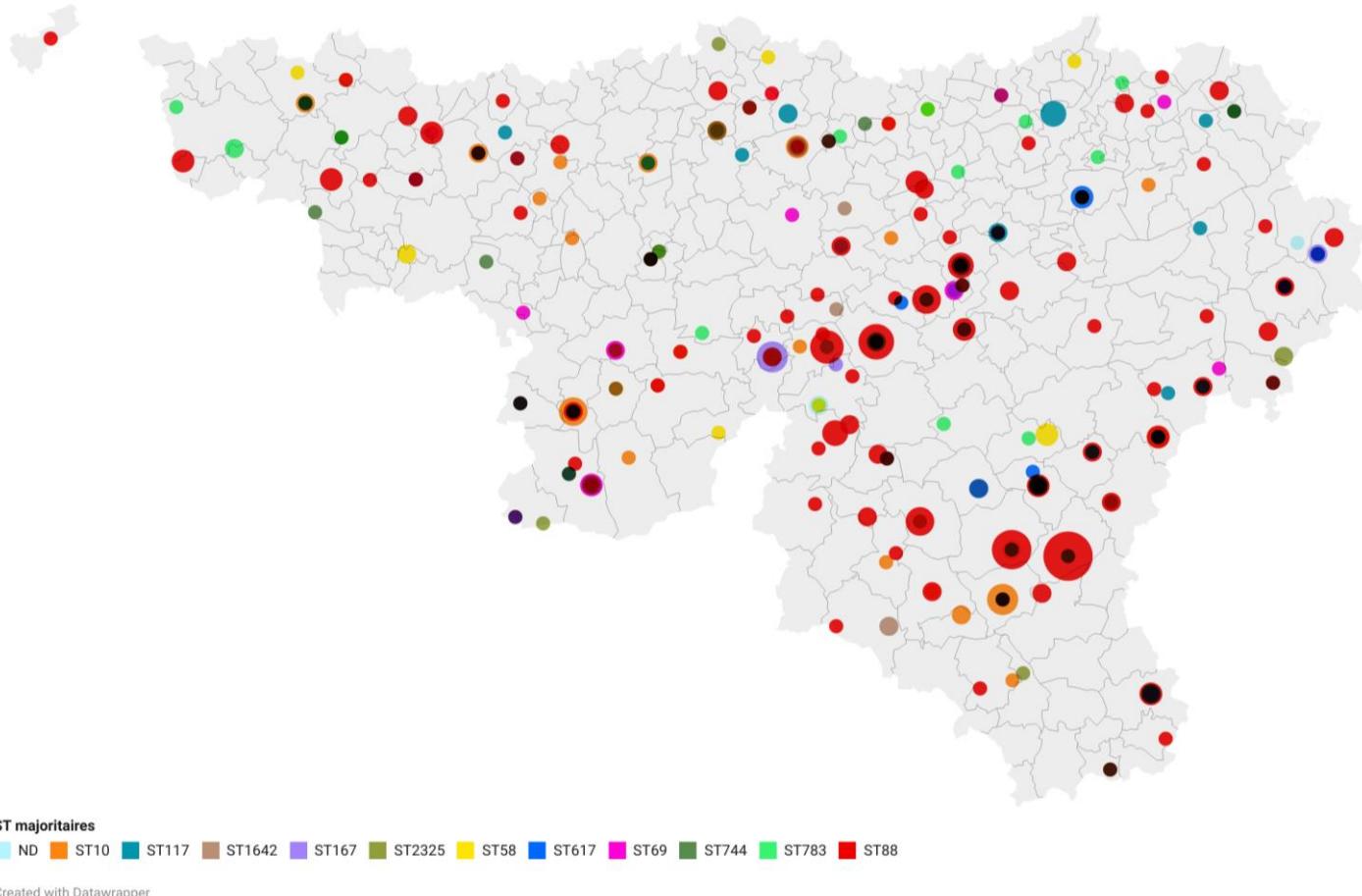
Disponible à l'adresse suivante : https://www.sig-gr.eu/fr/cartes-thematiques/agriculture/densite_bovins_porcins.html

Tableau I : Type séquentiel (ST) et complexes clonaux (CC) associés aux phylogroupes déterminés dans les 522 isolats d'*Escherichia coli* provenant de veaux diarrhéiques ou septicémiques collectés sur 3 saisons de vêlage successives (de 2017-2018 à 2019-2020)

ST	CC	Phylogroupes	Nombre d'isolats
ST10	10	A	56
ST58	155	B1	15
ST69	69	D	18
ST88	23	C	174
ST117	-	G	30
ST167	10	A	25
ST617	10	A	11
ST744	10	A	11
ST783	23	C	22
ST1642	-	B1	13
ST2325	467	A	16
Indéterminé	-	B1, C, D, U	6
Autres* (53 ST différents)	variés	A, B1, C, D, E, F, U	125

ST : type séquentiel (*sequence type*). CC : complexe clonal. *ST déterminés comportant moins de 10 souches. Phylogroupe U = inconnu (unknown)

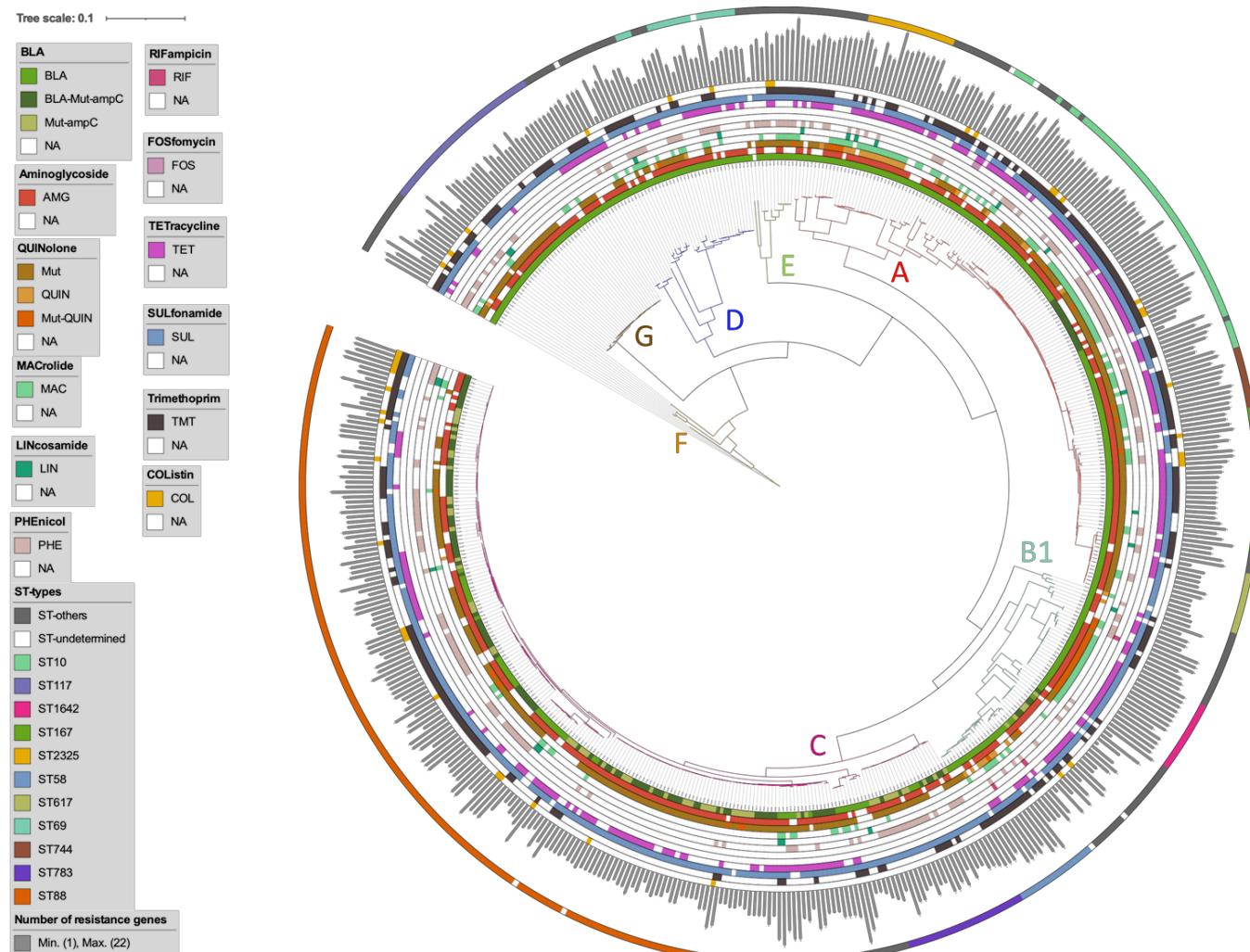
Figure 2 : Répartition géographique des ST majoritaires, comportant plus de 10 isolats, déterminés à partir des 522 séquences d'*Escherichia coli* provenant de veaux diarrhéiques ou septicémiques isolées en Wallonie pendant 3 saisons de vêlage successives (de 2017-2018 à 2019-2020)



Lorsqu'il y a des souches de différents ST pour une même localisation, les couleurs se superposent donnant par exemple les points noirs. La taille du cercle est proportionnelle au nombre de souches. Une version interactive de cette carte est disponible à l'adresse suivante <https://datawrapper.dwcdn.net/ZocXi/1/>.

Figure 3 : Phylogénie des 522 *Escherichia coli* isolées de bovins diarrhéiques ou septicémiques en Wallonie pendant 3 saisons successives de vêlage (de 2017-2018 à 2019-2020), représentant les phylogroupes, les familles de résistances aux antibiotiques détectées ainsi que le nombre total de gènes de résistance et les types séquentiels (ST)

Les phylogroupes sont indiqués et colorés au niveau des branches correspondantes de l'arbre. Les cercles de l'intérieur vers l'extérieur représentent les différentes familles d'antibiotiques avec une résistance. Le cercle gris présentant des barres de différentes tailles représente le nombre de gènes de résistance présent dans la souche (de 1 à 22). Enfin, le cercle extérieur représente les différents ST, définis lorsqu'il comporte plus de 10 souches et classifié comme « autre » lorsqu'il y a moins de 10 souches.



3.3 Gènes bla identifiés

De nombreux gènes *bla*, ainsi que des mutations dans le promoteur du gène *bla_{ampC}* ont été identifiés, parmi les souches. Les gènes identifiés sont présentés dans le tableau II, en association avec le nombre de souches concernées, ainsi que leurs ST et phylogroupes. Les souches possèdent souvent plusieurs gènes *bla*. Par exemple, le gène *bla_{TEM-1}* se retrouve fréquemment avec un gène *bla_{CTX-M}*.

Les mutations détectées dans le promoteur du gène *ampC* se situent aux positions -32 T>A (19 souches) et -42 C>T (166 souches). Les 19 souches présentant la mutation en -32 appartiennent toutes au ST88, tandis que pour la mutation en -42, les souches sont réparties dans les ST suivants : ST10 (15), ST56 (1), ST88 (119), ST162 (1), ST345 (5), ST783 (19), ST949 (1), ST3243 (1) et ST-indéterminé (4). La majorité de ces mutations se retrouve donc dans le ST88, avec 138 souches concernées sur les 174 appartenant au ST88.

3.4 Multi-résistance des *Escherichia coli bovins*

Les analyses avec Resfinder et Pointfinder ont également permis de détecter de nombreux gènes de résistance ainsi que des mutations ciblant d'autres familles d'antibiotiques que les β-lactamines, ce qui montre que la majorité des souches présentent des critères de multi-résistance, c'est-à-dire qu'elles sont résistantes à plus de trois familles d'antibiotiques. En effet, seules 6 souches présentent des gènes ou mutations de résistance à trois familles d'antibiotiques ou moins (Tableau III).

Les familles d'antibiotiques ciblées par un ou plusieurs gènes ou mutations de résistance sont les β-lactamines (521 *E. coli*), les sulfamidés (477 *E. coli*), les aminoglycosides (414 *E. coli*), les quinolones (392 *E. coli*), les diaminopyrimidines, représentées par le triméthoprime dans la figure 3 (280 *E. coli*), les tétracyclines (277 *E. coli*), les phénicolés (199 *E. coli*), les macrolides (162 *E. coli*), la colistine (42 *E. coli*), les lincosamides (22 *E. coli*), ainsi que les rifamycines (3 *E. coli*) et la fosfomycine (3 *E. coli*).

3.5 Facteurs de virulence des *Escherichia coli bovins*

De nombreux FV ont été détectés avec VirulenceFinder, dont certains sont associés à des protéines hypothétiques et dont le rôle précis n'est pas connu. Une étude plus approfondie de ces facteurs de virulence dépasse le cadre de ce travail, mais représente une perspective très intéressante pour le futur, d'autant que ces données pourront être mises en relation avec les résistances observées à de nombreux antibiotiques.

Tableau II : Gènes *bla* identifiés dans les *Escherichia coli* isolées de bovins, ST et phylogroupes des isolats concernés

Phénotype du gène détecté	Gènes <i>bla</i>	Nombre d'isolats	ST (nombre d'isolat si 1+)	Phylogroupes
BLSR	TEM-1 ^a	324	-66, -3, 10 (44), 34 (2), 46 (5), 48, 57 (4), 58 (10), 69 (12), 88 (103), 106 (2), 117 (26), 162 (2), 167 (11), 224 (2), 226, 345 (2), 361 (2), 362 (9), 410 (2), 457, 533, 540 (3), 542, 617 (6), 624, 648, 744 (11), 761 (6), 783 (5), 949, 950 (3), 973(2), 1141, 1431, 1585, 1642 (12), 2325 (16), 3714, 4981(4), 7469, 8152, Indéterminé (2)	A (112), B1 (35), C (111), D (26), E (7), F (3), G (26), U (2)
	TEM-104	1	69	D
	TEM-122	1	540	A
	TEM-135	1	10	A
	TEM-141	4	88 (2), 106, 973	C (2), D (2)
	TEM-150	11	69, 88	C, D
	TEM-168	1	-132	A
	TEM-176	6	16, 57, 58, 88, 167, 1494	A, B1 (3) , C, E
	TEM-190	4	48, 58 (3)	A, B1 (3)
IRT	CARB-2	3	10, 69, 4981	A (2), D
	OXA-1	95	-66, 10 (23), 34, 46 (4), 57 (4), 69 (5), 88 (21), 117, 162, 167 (6), 345, 354, 361, 362, 380 (2), 410 (4), 457, 540 (2), 624 (2), 648, 783 (4), 950 (2), 973 (2), 1140, 1615, 2325 (2)	A (39), B1 (4), C (31), D (8), E (7), F (5), G
	TEM-30	4	117, 973 (3)	D (3), G
	TEM-33	3	46, 88 (2)	A, C (2)
	TEM-35	2	88, 167	A, C
	CMY-2	12	10 (4), 16, 38, 46, 162, 167, 410 (2), 973	A (6), B1 (2), C (2), D (2)
	DHA-1	6	10, 354, 457, 2325 (3)	A (4), F (2)
BLSE	CTX-M-1 ^b	97	-132, 10 (8), 23 (3), 34, 46 (4), 58 (6), 59, 69 (7), 88 (10), 117 (9), 167 (2), 224(2), 226, 362 (4), 380 (3), 542, 648, 744 (3), 761 (2), 1431, 1642 (13), 2325 (12), 7469, indéterminé	A (35), B1 (27), C (13), D (11), F (2), G (9)
	CTX-M-3 ^b	6	57, 88 (3), 162, 167	A, B1, C (3), E

	CTX-M-15 ^b	56	10 (2), 46, 58 (3), 69, 88 (20), 117 (4), 167 (11), 361 (2), 362, 410 (2), 617 (2), 761 (2), 2325, 4981 (4)	A (25), B1 (3), C (22), D (2), G (4)
	CTX-M-32 ^b	26	-681, 10 (4), 69, 88 (7), 117 (2), 167, 226, 362, 533, 540, 744, 1291, 1434, 1494, 1722, 8152	A (11), B1 (3), C (7), D (2), F, G (2)
	CTX-M-55 ^b	21	10, 21, 23, 34, 69 (3), 88 (2), 167, 540, 617 (5), 744 (3), 1615, 3714	A (12), B1 (2), C (4), D (3)
	CTX-M-2 ^c	57	-3, 10 (11), 21, 29, 48 (3), 58 (7), 59 (2), 88, 101, 106, 117 (5), 155, 362 (3), 540, 744 (3), 761 (3), 783 (3), 949, 973 (4), 1141, 1494, 1585, 2325	A (23), B1 (13), C (4), D (9), F (2), G (5), U
	CTX-M-14 ^d	55	-66, 10 (9), 48, 57 (6), 69 (5), 88 (5), 106 (2), 117 (10), 167 (6), 617 (4), 744, 783, 950, 973, 1585, indéterminé	A (21), C (7), D (9), E (7), G (10), U
	CTX-M-27 ^d	4	167, 457 (3)	A, F (3)
	CTX-M-65 ^d	7	10 (3), 58, 533, 683 (2)	A (3), B1 (4)
	TEM-112	1	167	A
	OXA-10	3	58, 533, 683	B1 (3)

BLSR : β -lactamases-à-spectre-restréint. IRT : variant de *bla_{TEM}* résistant aux inhibiteurs des β -lactamases. AmpC : céphalosporinases. BLSE : β -lactamases-à-spectre-étendu. a : les types A, B, C et D ont été détectés. b : gènes *bla_{CTX-M}* apparentés au groupe 1. c : gènes *bla_{CTX-M}* apparentés au groupe 2. d : gènes *bla_{CTX-M}* apparentés au groupe 9. ST avec nombre négatif : ST déterminé de manière non exacte.

Tableau III : Nombre de famille d'antibiotiques ciblées par au moins un gène ou une mutation de résistance dans les 522 *Escherichia coli* isolées de bovins en Wallonie sur 3 saisons de vêlage successives (de 2017-2018 à 2019-2020)

Nombre de famille(s) d'antibiotiques ciblée(s)	Nombre total d'isolats	Familles d'antibiotiques ciblées* (nombre d'isolats concernés si différent du total)
0	1	–
1	3	BLA,
2	2	BLA, QUIN
3	13	BLA, AMG (7), QUIN (2), MAC (3), TET (4), SUL (6)
4	26	BLA, AMG (21), QUIN (3), MAC (1), LIN (4), TET (14), SUL (21), TMT (6)
5	86	BLA, AMG (76), QUIN (54), MAC (2), PHE (12), TET (36), SUL (80), TMT (18), COL (1)
6	144	BLA, AMG (125), QUIN (104), MAC (16), PHE (51), FOS (1), TET (80), SUL (137), TMT (60), COL (2)
7	117	BLA, AMG (83), QUIN (105), MAC (31), LIN (1), PHE (66), RIF (1), TET (54), SUL (109), TMT (90), COL (14)
8	102	BLA, AMG (81), QUIN (101), MAC (81), LIN (5), PHE (51), RIF (2), TET (69), SUL (97), TMT (79), COL (17)
9	27	BLA, AMG (20), QUIN (20), MAC, LIN (12), PHE (18), FOS (2), TET (20), SUL (26), TMT (26), COL (7)
10	1	BLA, AMG, QUIN, MAC, PHE, SUL, TMT, COL

* Un isolat présente des résistances à l'une ou l'autre de ces familles pour atteindre le total donné en colonne 1. BLA : β -lactamines. AMG : Aminoglycosides. QUIN : Quinolones. MAC : Macrolides. LIN : Lincosamides. PHE : Phénicolés. RIF : Rifamycines. FOS : Fosfomycine. TET : Tétracyclines. SUL : Sulfamidés. TMT : Triméthoprime, représentant des diaminopyrimidines. COL : Colistine.

4. Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence une grande diversité génétique dans les *E. coli* d'origine bovine présentant une résistance aux céphalosporines.

En effet, non seulement un très grand nombre de ST a été détecté, en proportions très variables, mais en plus, ceux-ci sont répartis dans sept phylogroupes différents sur les huit décrits actuellement (Clermont *et al.*, 2019 ; Beghain *et al.*, 2018). Le seul phylogroupe qui n'est pas représenté est le phylogroupe B2, majoritairement associé à des *E. coli* uropathogènes chez l'être humain (Tourret et Denamur, 2016). Le groupe C est majoritaire, ce qui va à l'encontre de ce qui a été décrit jusqu'à présent (Beghain *et al.*, 2018). Peut-être est-ce dû à sa prépondérance dans les espèces animales, bien que cette hypothèse n'a pas l'air d'être confirmée au vu du faible nombre d'*E. coli* appartenant au phylogroupe C décrit dans la littérature (Reid *et al.*, 2020 ; Sadikalay *et al.*, 2018 ; Müştak *et al.*, 2015). De plus, ce phylogroupe prépondérant est associé au ST88, qui semble fortement associé aux mutations dans le promoteur du gène *ampC*. Des analyses plus approfondies seront nécessaires afin de comprendre cette apparente relation.

La majorité des souches étudiées présente des résistances multiples, à de nombreuses familles d'antibiotiques supplémentaires aux β-lactamines. Cela n'est pas réellement surprenant puisqu'il est bien connu que les gènes codant pour les BLAs se retrouvent souvent sur des plasmides, qui peuvent aussi porter d'autres gènes de résistance, parfois nombreux. Par exemple, les plasmides de type IncF sont fréquemment décrits comme portant des gènes de résistance codant pour des BLSE, des CP, des enzymes modifiant les aminoglycosides ainsi que des gènes de résistance aux quinolones (Rozwandowicz *et al.*, 2018). Le type de séquençage réalisé ne permet pas une analyse approfondie de ces plasmides et des gènes portés. Il faudrait pour cela réaliser un séquençage de type *long-reads* (Quainoo *et al.*, 2017).

Concernant les facteurs de virulence, de très nombreux gènes ont été détectés, mais leur rôle n'est pas toujours connu. De plus, ces facteurs sont surtout détaillés pour leur pathogénicité chez l'être humain (Malberg Tetzschner *et al.*, 2020 ; Joensen *et al.*, 2014). Une étude plus approfondie dépasse le cadre de ce travail, mais représente une perspective très intéressante, d'autant que ces données pourront être mises en relation avec les résistances observées à de nombreux antibiotiques.

De plus amples analyses seront donc nécessaires afin de déterminer les relations entre ces différentes souches ainsi qu'entre leurs caractéristiques de résistance et de virulence. De plus, ces données pourront également être comparées à des bases de données de séquences, pour tenter de comprendre la situation de ces souches d'un point de vue plus global, par exemple en les comparant à des souches humaines ou environnementales.

Références

- Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom.* 2018, 4:e000192. DOI: 10.1099/mgen.0.000192
- Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, Denamur E, Gordon D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol.* 2019, 21:3107-3117
- Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2014, 52:1501-1510
- Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol.* 2015, 53:2410-2426
- Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutz F. *In Silico* Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol.* 2020, 58:e01269-20. DOI: 10.1128/JCM.01269-20
- Müştak HK, Günaydin E, Kaya İB, Salar MÖ, Babacan O, Önay K, Ata Z, Diker KS. Phylo-typing of clinical *Escherichia coli* isolates originating from bovine mastitis and canine pyometra and urinary tract infection by means of quadruplex PCR. *Vet Q.* 2015, 35:194-199
- Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum SAFT, Huynen MA, Melchers WJG, van Schaik W, Wertheim HFL. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2017, 30:1015-1063
- Reid CJ, Blau K, Jechalke S, Smalla K, Djordjevic SP. Whole Genome Sequencing of *Escherichia coli* From Store-Bought Produce. *Front Microbiol.* 2020, 10:3050. DOI: 10.3389/fmicb.2019.03050
- Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2018, 73:1121-1137
- Sadikalay S, Reynaud Y, Guyomard-Rabenirina S, Falord M, Ducat C, Fabre L, Le Hello S, Talarmin A, Ferdinand S. High genetic diversity of extended-spectrum β-lactamases producing *Escherichia coli* in feces of horses. *Vet Microbiol.* 2018, 219:117-122
- Tourret J, Denamur E. Population Phylogenomics of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 201, 4. DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0010-2012

Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:2764-2768

Discussion – Perspectives

Différents aspects de la résistance aux β -lactamines retrouvée chez des *E. coli* de veaux diarrhéiques et/ou septicémiques ont été étudiés, apportant de nombreuses informations sur ce sujet complexe.

Les données phénotypiques de la première étude, concernant uniquement les *E. coli* pathogènes, montrent que les résistances de types BLSE et AmpC, bien que très problématiques, ne sont pas majoritaires, tandis qu'aucune résistance de type CP n'a été détectée. Cependant, les trois autres études mettent également en avant le rôle de réservoir de la flore commensale, qu'il ne faut pas négliger. L'étude de l'aspect génétique de ces résistances (via les études 2, 3 et 4) a en effet permis de montrer que les gènes *bla* présents sont les mêmes dans les isolats pathogènes et non-pathogènes. Enfin, au travers des études 1 et 3, un suivi temporel de ces résistances a été réalisé, tandis que l'étude 4 associe également l'aspect géographique à ces résistances pour les isolats étudiés.

La différence entre le nombre total d'isolats collectés (plus de 3500) et le nombre plus faible d'isolats analysés dans les différentes études s'explique par le fait que les études se sont principalement intéressées aux isolats présentant un phénotype de résistance autre que BLSR, notamment les BLSE et les AmpC qui présentent un intérêt en santé publique (OMS, 2017). De plus, le protocole de collecte des isolats se devait de respecter au maximum la routine de diagnostic pratiquée à l'ARSIA. Ainsi, seuls les MF/CI sont ensemencés sur le milieu McC-CTX, et les isolats BLSR ne poussent pas sur ce milieu. Il y a donc une différence entre le nombre d'isolats présentant une résistance aux β -lactamines, tous phénotypes confondus, et le nombre d'isolats croissant sur le milieu McC-CTX. Cela pourrait se traduire par un biais dans les études, mais celui-ci a été limité puisque les études comparant les *E. coli* pathogènes et non-pathogènes se sont concentrées sur les isolats ayant un phénotype autre que BLSR, et donc croissant sur le milieux McC-CTX. L'étude 1 réalisant le suivi de tous les phénotypes de résistance n'a quant à elle été réalisée que sur les *E. coli* pathogènes, testées par antibiogramme en routine à l'ARSIA, ce qui a permis d'éviter un éventuel biais lié à l'utilisation du milieu McC-CTX dans la méthodologie de récolte des isolats.

L'utilisation de ce milieu sélectif contenant une C3G a également permis d'isoler et de collecter un grand nombre d'isolats AmpC-like, un phénotype inattendu puisque ne présentant pas de résistance aux C3G à l'antibiogramme. Deux hypothèses permettraient d'expliquer ce fait.

La première hypothèse concerne la dégradation de la CTX du milieu qui, dès lors, ne serait plus sélectif. En effet, la CTX a une activité optimale à un pH de 7.1 +/- 0.2 (Hasman *et al.*, 2017) et lors de l'hydrolyse de la CTX par une BLA, il y a libération d'un proton (Frère, 2012), ce qui entraîne une diminution du pH dans le milieu et pourrait ainsi rendre la CTX moins efficace. La seconde hypothèse est que les isolats ayant un phénotype AmpC-like exprimeraient trop faiblement leur résistance aux C3G *in vitro*, lors de l'antibiogramme, ce qui concorderait avec une croissance observée sur le milieu et, parallèlement, avec un antibiogramme ne montrant pas de résistance aux C3G (Osei Sekyere *et al.*, 2015).

Pour pallier à cela, il faudrait ensemencer les mêmes isolats sur un milieu contenant une autre C3G. En effet, il a été démontré qu'un seul antibiotique sélectif détectait de manière variable les bactéries productrices de BLSE et donc, qu'un seul milieu détectant tous les isolats avec un phénotype BLSE semble peu plausible, tandis qu'une combinaison de deux milieux contenant chacun un antibiotique différent, par exemple avec la céfotaxime et la ceftazidime, montre un très bon taux de détection des souches productrices de BLSE (Wilson et McCabe, 2007). Pour des raisons pratiques, il n'était pas possible d'utiliser deux milieux avec deux antibiotiques différents, et le choix de l'utilisation du milieu McConkey-CTX s'est appuyé sur le protocole européen de détection des *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de CP (Hasman *et al.*, 2019). Bien que les mutations dans le promoteur du gène *ampC* détectées par WGS (études 2 et 4) soient en faveur de cette deuxième hypothèse, elle n'a pas été démontrée avec certitude. Il faudrait étudier la quantité d'enzyme produite et pour ce faire, l'utilisation de la *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* semble adaptée (Goerke *et al.*, 2001 ; Tracz *et al.*, 2005).

En effet, des données de la littérature montrent que les mutations dans le promoteur du gène *ampC* détectées par WGS (études 2 et 4) peuvent entraîner une surexpression du gène *ampC* pouvant conduire à une augmentation de la résistance. Cependant, ces différentes mutations (-42, -32, -18 et -1) ont différents impacts sur l'expression d'*ampC*. Ainsi, la mutation du nucléotide -42 (C>T) conduit à la création d'une séquence consensus -35 alternative qui modifie le site d'initiation de la transcription. La mutation du nucléotide -32 (T>A) donne une homologie parfaite à la séquence consensus -35 et est avec la mutation en -42 le facteur dominant dans le renforcement du promoteur. La substitution du nucléotide G par A en position -18 crée une séquence consensus -10 alternative, très souvent associée à la mutation en -42. Ces trois mutations augmentent l'expression du gène *ampC*, tandis que la mutation au niveau du nucléotide -1 n'a aucun effet reconnu sur l'expression du gène *ampC* (Caroff *et al.*, 2000 ; Mulvey *et al.*, 2005 ; Tracz *et al.*, 2007).

D'un point de vue phénotypique, l'évolution des résistances est statistiquement significative (étude 1), ce qui confirme les observations réalisées par les laboratoires vétérinaires (ARSIA, 2017 et 2020 ; ANSES, 2017 et 2020 ; DGZ, 2021), tant pour la diminution des résistances aux céphalosporines, représentées par les phénotypes BLSE, AmpC et AmpC-like, que pour l'augmentation des résistances aux pénicillines, avec le phénotype BLSR. Les gènes impliqués dans ces phénotypes de résistances ont été identifiés dans les études 2, 3 et 4, mais il n'est pas possible de conclure à l'évolution d'un gène en particulier. De plus, cette évolution apparente des résistances est assez lente, puisqu'elle se fait sur plusieurs saisons de vêlages consécutives avant d'observer une évolution significative. Or, les gènes n'ont été étudiés que pendant 3 saisons de vêlage successives, où l'évolution phénotypique n'est pas significative d'une année à l'autre. Pour les phénotypes BLSE et AmpC, cela peut aussi s'expliquer par le nombre relativement faible d'*E. coli* productrices de BLSE ou d'AmpC par rapport au nombre total d'*E. coli* d'origine bovine testées. Les taux de résistances observés rejoignent également les observations

réalisées au niveau européen par l'EFSA, avec une majorité de résistance représentée par le phénotype BLSR et un plus faible taux de résistance aux céphalosporines (EFSA, 2020), bien que l'origine des isolats étudiés soit différente. Cette comparaison pourra à l'avenir être améliorée par l'utilisation du réseau EARS-Vet (Mader *et al.*, 2021), qui prendra en compte les analyses réalisées sur les bactéries isolées d'animaux malades.

Au niveau mondial, les seules données disponibles concernent l'utilisation des antibiotiques chez les animaux et montrent qu'en Europe, les pénicillines sont la 2^{ème} famille d'antibiotiques utilisée tandis qu'elles sont la 4^{ème} famille en Asie et en Amérique et la 5^{ème} famille en Afrique. Les céphalosporines, toutes générations confondues, sont plus utilisées en Asie (1,6%) qu'en Afrique (0,8%), en Europe (0,7%) ou en Amérique (0,3%) (OIE, 2021).

Les évolutions de ces différents phénotypes peuvent être expliquées par plusieurs hypothèses. Tout d'abord, la relation entre l'utilisation d'un antibiotique et les résistances qui lui sont liées n'est plus à démontrer (*Cf. Introduction points 2 et 3.2*). Il est donc probable qu'une diminution de la consommation d'antibiotiques (BelVetSac, 2019) entraîne une diminution de la résistance à ces mêmes antibiotiques, pour autant qu'il n'y ait pas d'autres avantages sélectifs pour la bactérie à posséder cette résistance en particulier. Bien qu'un manque de données concernant l'utilisation des antibiotiques chez les bovins par rapport à d'autres espèces comme le porc ou la volaille soit constaté (BelVetSac, 2019), l'hypothèse selon laquelle l'AR-2016 montre son impact est fort probable. En effet, en supposant une diminution de l'utilisation des C3G/C4G, celle-ci a été suivie d'une diminution des résistances associées à ces antibiotiques, au contraire des résistances de types BLSR qui augmentent, conséquence probable de l'augmentation de l'utilisation des antibiotiques ciblés par ces résistances en tant que traitement de première ligne (BelVetSac, 2019).

Cette augmentation des phénotypes BLSR pourrait également être due à une co-sélection de la résistance aux β-lactamines par l'utilisation d'un antibiotique d'une autre famille, auquel la bactérie serait également résistante. En effet, les résistances aux β-lactamines se retrouvent souvent sur des plasmides, qui peuvent porter d'autres gènes de résistance, parfois nombreux, et qui peuvent être transférés entre bactéries. Par exemple, les plasmides de type IncF sont fréquemment décrits comme portant des gènes de résistance codant pour des BLSE, des CP, des enzymes modifiant les aminoglycosides ainsi que des gènes de résistances aux quinolones (Rozwandowicz *et al.*, 2018). Ainsi, le plasmide IncFII d'*E. coli* d'origine humaine est connu pour son association, dans le ST131, avec le gène *bla_{CTX-M-15}*, mais est également porteur d'autres gènes de résistance comme *tet*, *oxa*, *mphA*, *catB4*, *sull*, *dfrA7*, *aac*, et *aadA5* (Naseer et Sundsfjord, 2011).

Bien que les analyses génétiques réalisées dans les études 2 et 4 ont permis de détecter des gènes de résistances à d'autres familles d'antibiotiques que les β-lactamines, l'étude des plasmides n'a pas été réalisée. En effet, le type de séquençage utilisé ne permettait pas une analyse précise des plasmides

(Quainoo *et al.*, 2017). Pour le moment, il n'est donc pas possible de conclure à une association de gènes de résistance situés sur un plasmide particulier pouvant corroborer l'hypothèse de co-sélection des résistances de type BLA. Cependant, comme la majorité des *E. coli* étudiées présentent des multi-résistances, cette hypothèse est plausible.

De plus, aucune information sur la consommation d'antibiotique par l'animal porteur de l'isolat récolté n'a pu être collectée. Cela rend donc très difficile l'interprétation précise du lien entre résistance et antibiotique au niveau de la souche bactérienne étudiée. L'hypothèse qu'un traitement antibiotique soit lié à la résistance observée semble très probable, notamment par l'observation dans l'étude 1, que les *E. coli* provenant d'organes ou de CI de veaux autopsiés présentent plus de résistance de type AmpC/AmpC-like que celles isolées sur les MF des veaux diarrhéiques. Cette constatation concorde avec l'hypothèse que les veaux autopsiés, majoritairement de type viandeux, sont traités avant autopsie, d'autant que, de par leur valeur économique, un traitement préventif est souvent mis en place lors de problèmes dans l'exploitation. De plus, l'utilisation quasi systématique d'antibiotique lors de la réalisation des césariennes sans protocole défini (Djebala *et al.*, 2019) pourrait également influencer les résistances observées chez les veaux de type viandeux. En production laitière, l'utilisation intramammaire de β-lactamines est très fréquente lors de mammite ou au tarissement (CBIP-vet, 2021), ce sont d'ailleurs les antibiotiques les plus utilisés en Belgique (BelVetSac, 2019) et des résidus de ces antibiotiques peuvent se retrouver dans le lait, qui s'il est donné, même pasteurisé, aux veaux, va influencer les résistances retrouvées chez les *E. coli* (Maynou *et al.*, 2017). De plus amples analyses seront nécessaires afin d'améliorer la compréhension de ce lien entre résistance présente et antibiotique utilisé.

L'étude 1 met également en avant une recrudescence des phénotypes AmpC sur la dernière saison étudiée. L'origine génétique de ces résistances demeure cependant inconnue, puisque ces isolats n'ont pas été étudiés dans les études 2 et 4. Cela prouve cependant la nécessité de continuer le suivi des résistances aux β-lactamines, tant d'un point de vue phénotypique que génétique. D'autant plus qu'à long terme, cette augmentation de certains profils de résistance pourrait être problématique.

Les antibiotiques autorisés en médecine vétérinaire peuvent être répartis en trois groupes, associé à un code couleur, sur base de critères microbiologiques reprenant les spectres des mécanismes de résistance, les possibilités de transfert entre bactéries des gènes de résistance et l'importance de ces résistances en médecine humaine (AMCRA, 2021). Les antibiotiques « jaunes », parmi lesquels sont classés les pénicillines et les C1G/C2G, et « oranges », comportant notamment l'amoxicilline, sont à utiliser comme premier, deuxième ou troisième choix en fonction des pathologies et pathogènes concernés. Les antibiotiques « rouges », à savoir les quinolones et les C3G/C4G, ont été classés uniquement comme troisième choix, notamment en raison de l'importance de ces antibiotiques pour la médecine humaine. Les profils de résistance de type BLSR sont donc résistants aux β-lactamines « jaunes » et « oranges », ce qui implique qu'une utilisation des β-lactamines « rouges » pourrait être autorisées sous certaines

conditions déterminées : « *qu'un examen de laboratoire complémentaire (examen bactériologique et/ou PCR, sérologie, cytologie,...) appuie le diagnostic et que le test de susceptibilité aux antibiotiques révèle qu'il n'existe pas d'alternative jaune ou orange. Si un examen de laboratoire complémentaire et un test de susceptibilité aux antibiotiques sont impossibles ou ne sont pas immédiatement disponibles et à moins que l'activité des antibiotiques jaunes ou orange ne soit incontestable, un antibiotique rouge peut être utilisé s'il semble que celui-ci est un choix thérapeutique judicieux (sur base des données de la littérature)* » (AMCRA, 2021).

Finalement, à plus ou moins long terme la situation pourrait s'inverser et il pourrait y avoir une recrudescence des résistances de types BLSE, AmpC et AmpC-like. Cela souligne l'importance d'agir, non seulement sur l'utilisation des antibiotiques, mais également sur l'environnement et l'optimisation de la gestion des troupeaux, afin de lutter efficacement contre ces résistances. L'ARSIA a ainsi lancé en 2017 un programme, en collaboration avec ses partenaires du monde agricole, nommé ALTIBIOTIQUE, contraction des termes « ALternatif » et « antIBIOTIQUE », qui propose des solutions concrètes pour éviter le recours aveugle aux antimicrobiens dans la gestion sanitaire des troupeaux. Le but est de développer avec les professionnels des secteurs de l'élevage et de la santé animale des approches préventives capables d'éviter le développement des maladies. Ainsi, le transfert d'immunité colostrale, l'hygiène du bâtiment et du matériel d'élevage, la maîtrise d'ambiance d'étable, l'optimisation du logement, la vaccination, et d'autres thématiques sont développées dans le cadre des activités liées à ce programme « Altibiotique » (ARSIA, 2017).

L'aspect génétique de ces résistances, abordé par le suivi des gènes *bla* réalisé dans les populations pathogènes et non-pathogènes d'*E. coli* pendant trois saisons de vêlage (étude 2 à 4), est très intéressant sur plusieurs points. Tout d'abord, il n'a pas mis en évidence de différence au niveau des gènes de résistance entre ces deux populations. Il est donc clair qu'une population d'*E. coli* provenant du même animal peut avoir des caractéristiques pathogènes différentes, tout en partageant une similarité de gènes de résistance. Cette absence de différence entre les gènes de résistance présents chez les *E. coli* pathogènes et non-pathogènes montre le rôle de la flore commensale en tant que réservoir de gènes de résistance (Bag *et al.*, 2019), ce qui est d'une grande importance, plus encore que le rôle de réservoir de l'animal par rapport à l'homme qui, bien que fort suspecté, manque de mise en évidence de transmission directe (Argudin *et al.*, 2017 ; Madec *et al.*, 2017).

En effet, les analyses de la résistance aux antibiotiques se concentrent souvent sur des échantillons soit d'origine commensale, soit d'origine pathogène, ces derniers étant beaucoup plus étudiés de par leur intérêt clinique (Bag *et al.*, 2019 ; O'Neil, 2016). Or, l'utilisation d'antibiotiques affecte également le microbiote de l'hôte, donc les bactéries commensales, et pas seulement le pathogène ciblé (Kim *et al.*, 2017). L'originalité des études (2 à 4) présentées ici provient en partie du fait que les *E. coli* sont toutes originaires de veaux diarrhéiques ou septicémiques et ont été collectées en même temps, à partir des mêmes échantillons. L'absence de différence sur le contenu des gènes de résistance, entre ces *E. coli*

pathogènes ou non-pathogènes d'un point de vue phénotypique, montre donc bien la possibilité du rôle de réservoir de la flore commensale. Un point intéressant aurait été de connaître les traitements antibiotiques donnés aux veaux ou dans l'élevage pour lier ces données aux résistances observées. Malheureusement, les anamnèses accompagnant les échantillons envoyés pour analyses à l'ARSIA ne faisaient que très rarement mention de ces traitements éventuels. Pour aller plus loin, outre la collecte précise des traitements antibiotiques reçus par les veaux, des études du résistome de la flore intestinale pourraient être envisagées, tant sur animaux sains que malades, avec ou sans traitement antibiotique au niveau de l'élevage. En effet, les impacts d'une utilisation d'antibiotique affectent tous les micro-organismes, parfois même à long terme (Gasparrini *et al.*, 2019), même s'ils appartiennent à différentes populations en contact les unes avec les autres (Sun *et al.*, 2020).

Concernant les gènes *bla* mis en évidence dans ces deux populations d'*E. coli*, il est important de retenir qu'à part pour quatre isolats, où trois variants BLSE de *bla_{TEM}* ont été détectés (*bla_{TEM-52}*, *bla_{TEM-112}* et *bla_{TEM-168}*), les gènes codant pour une BLSE appartiennent tous à la famille des gènes *bla_{CTX-M}*. De plus, la majorité des isolats présentent un gène *bla_{CTX-M}* appartenant au groupe 1, ce qui est en accord avec les données de la littérature. En effet, le gène *bla_{CTX-M-1}* est le gène codant pour une BLSE le plus fréquemment retrouvé chez le bétail en Europe (Ewers *et al.*, 2012 ; Michael *et al.*, 2017), tandis que le gène *bla_{CTX-M-9}* a aussi été détecté dans des isolats de bovins, où il est relativement prévalent (Valat *et al.*, 2012). Quant au gène *bla_{CTX-M-2}* il est présent à moindre fréquence dans des isolats d'origine bovine (Michael *et al.*, 2017). Cela concorde avec nos résultats, bien que d'après l'étude 3, les gènes *bla_{CTX-M}* appartenant au groupe 2 ont une prévalence proche de ceux appartenant au groupe 9. Conformément aux résultats phénotypiques, aucun gène *bla_{CP}* n'a été identifié dans l'ensemble des souches séquencées (études 2 et 4).

La mise en relation des données phénotypiques et génétiques montre donc une très bonne concordance entre les gènes *bla* détectés par WGS et les phénotypes de résistances observés à l'antibiogramme. L'identification par MA montrait une moins bonne corrélation, qui est liée à la technique en elle-même, puisqu'elle cible un nombre limité de gènes. L'approche génomique pour le suivi des résistances est de plus en plus utilisée, comme avec Resfinder version 4.0 (Bortolaia *et al.*, 2020) ou le projet GLASS de l'OMS (OMS, 2020), mais cela pose question. En effet, la détection d'un gène de résistance ne permet pas d'affirmer qu'il sera responsable d'une résistance de la bactérie *in vitro* ou *in vivo*. Ce gène pourrait ne pas être exprimé, et donc ne pas induire de résistance chez la bactérie. De plus, plusieurs mécanismes de résistance existent et cohabitent souvent au sein d'une même bactérie. Il est également possible d'avoir des gènes présents dans la bactérie qui ne sont pas détectés par le WGS. Le gène peut ainsi se trouver dans une région peu ou pas séquencée et par là même, il ne serait pas détecté par les programmes utilisés pour analyser les séquences obtenues. D'une grande utilité dans la détection « d'épidémie émergente », le WGS reste encore peu utilisé par les laboratoires de diagnostic en médecine humaine et, au vu de son coût actuel, ne sera probablement pas utilisé avant plusieurs années en diagnostic

vétérinaire, si tant est qu'il le soit un jour. Par contre, l'identification des BLAs à l'aide du MALDI-TOF pourrait être une alternative au WGS, en combinant l'identification de la bactérie avec une détection des BLAs, permettant du même coup de diminuer le temps nécessaire à la détection des résistances aux β -lactamines (Ota *et al.*, 2019 ; Oviaño *et al.*, 2017).

Le manque de données liées aux analyses par WGS de grande envergure, pour l'aspect animal et environnemental, s'est fait ressentir pendant l'étude 4. En effet, lors des analyses, de nombreux points ont été observés, tels que la prévalence du phylogroupe C, une association potentielle du ST88 avec les mutations en -42 ou -32 dans le promoteur du gène *ampC*, ainsi que la moindre fréquence de gènes codant pour une BLSE lorsque l'une de ces deux mutations est présente. Une recherche dans la littérature n'a cependant pas permis d'éclairer ces différents points, qui restent à explorer.

L'étude 4 a mis en évidence une grande diversité dans les *E. coli* isolées de veaux diarrhéiques ou septicémiques présentant une résistance aux céphalosporines. La répartition géographique de ces souches, ainsi que l'arbre phylogénétique ne permettent pas de mettre en évidence des foyers précis, avec une souche ou un mécanisme de résistance précis qui se serait transmis au sein de la population bovine. Pour aller plus loin dans ces analyses, il faut lier arbre phylogénétique et carte géographique, en y incluant les caractéristiques des souches.

Enfin, les données génomiques obtenues dans ces différentes études pourront également être comparées avec des données humaines disponibles dans les bases de données, comme Enterobase (Zhou *et al.*, 2020). Cela permettra de voir s'il existe des spécificités d'hôtes entre les types d'*E. coli* observés dans les études 2 et 4, ainsi que d'observer d'éventuels transferts entre les différents réservoirs (humain, animal et environnemental). Pour cela, une analyse approfondie des plasmides serait idéale, puisque c'est principalement par transfert horizontal de gène (THG) que se fait la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques, mais aussi des gènes de virulence (Davies et Davies, 2010). Pour rappel, ce THG peut s'effectuer de trois manières différentes : par conjugaison, avec la transmission d'un plasmide entre bactéries donneuse et receveuse ; par transformation avec l'acquisition d'ADN se trouvant dans l'environnement ; ou par transduction, avec l'intervention d'un phage qui transfère un fragment d'ADN d'une bactérie à une autre (Soucy *et al.*, 2015). En étudiant les plasmides, il serait donc envisageable de détecter des transferts de gènes de résistance entre les souches étudiées.

Pour conclure, la lutte contre l'antibiorésistance est effectivement multifactorielle, et comprendre ses différents aspects est indispensable pour agir efficacement. Cette compréhension passe inévitablement par un suivi phénotypique des résistances présentes dans la population d'*E. coli* pathogènes, via les diagnostics de laboratoire, mais il ne faut pas négliger l'aspect de réservoir de ces résistances que possède la population non-pathogène. Pour un suivi plus fin, les analyses génétiques sont très intéressantes, et le WGS permet d'analyser les résistances d'une manière plus globale, en tenant compte des spécificités des souches étudiées. Bien que la situation soit alarmante, les observations réalisées dans

le cadre de ce travail sont encourageantes. En effet, aucun gène codant pour des CP n'a été mis en évidence dans les *E. coli* étudiées, et les taux de résistance aux C3G/C4G sont relativement bas, avec une diversité génétique présente, mais peu importante par rapport à ce qui se retrouve en médecine humaine. Enfin, suite à la législation sur l'utilisation des céphalosporines de dernières générations, une diminution de la résistance qui y est associée est observée. Cette diminution, bien que lente est une très bonne nouvelle, qui devrait inciter à continuer les efforts actuellement engagés tout en ayant recours à des alternatives afin de rationaliser l'utilisation d'antibiotiques, tant en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine.

Bibliographie

NOTE : Les bibliographies spécifiques aux études 1 à 4 se retrouvent à la fin de celles-ci.

Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature, 1940, 146:837

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Résapath - Réseau d'épidémirosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2016, Lyon et Ploufragan-Plouzané, France, rapport 2017, 147pp.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Résapath - Réseau d'épidémirosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2019, Lyon et Ploufragan-Plouzané-Niort, France, rapport 2020, 155 pp.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980, 289:321-331

Argudin MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, Nonhoff C, Roisin S. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. Antibiotics, 2017, 6:12 DOI:10.3390/antibiotics6020012

Arlet G, Brami G, Décrè D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. FEMS Microbiol Lett. 1995, 134:203-208

Arrêté Royal du 21 juillet 2016 (AR-2016). Arrêté royal relatif aux conditions d'utilisation des médicaments par les médecins vétérinaires et par les responsables des animaux : http://www.etaamb.be/fr/arrete-royal-du-21-juillet-2016_n2016024152.html Consulté le 29 avril 2021.

Association régionale de santé et d'identification animal (ARSIA). Antibiogrammes, rapport d'activité et résultats de l'ARSIA. 2017. Document lié : <https://www.arsia.be/wp-content/uploads/documents-telechargeables/RA-2017-light-Quality.pdf>

Association régionale de santé et d'identification animal (ARSIA). Rapport d'activité et résultats de l'ARSIA. 2019. Document lié : <https://www.arsia.be/wp-content/uploads/documents-telechargeables/RA-2019-web.pdf>

Association régionale de santé et d'identification animal (ARSIA). Projet Altibiotique. 2017. Informations obtenues à l'adresse suivante : <https://www.amcra.be/fr/bovins/altibiotique-le-projet-de-larsia-rcolte-un-franc-sucess/?lid=23815>

Azactam, Résumé des caractéristiques du produit (RCP). Bristol-Myers Squibb. Disponible à l'adresse : <https://bijsluiters.fagg-afmps.be/registrationSearchServlet?key=BE132352&leafletType=leafletFR>

Babini GS, Livermore DM. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? Antimicrob Agents Chemother. 2000, 44:2230. DOI: 10.1128/aac.44.8.2230-2230.2000

- Bag S, Ghosh TS, Banerjee S, Mehta O, Verma J, Dayal M, Desigamani A, Kumar P, Saha B, Kedia S, Ahuja V, Ramamurthy T, Das B. Molecular Insights into Antimicrobial Resistance Traits of Commensal Human Gut Microbiota. *Microb Ecol*. 2019, 77:546-557
- Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990, 18:294-298
- Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phlyotyping. *Microb Genom*. 2018, 4:e000192. DOI: 10.1099/mgen.0.000192
- Bergthorsson U, Ochman H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*. 1998, 15:6-16
- Bernot A. Genome, Transcriptome and Proteome Analysis. John Wiley and Sons Ltd., 1^{ère} édition, 2004, 231 pp.
- Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wieczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020, 75:3491-3500
- Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001, 14:933-951
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995, 39:1211-1233
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010, 54:969-976
- Bush K. Characterization of β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989, 33:259-263
- Caroff N, Espaze E, Gautreau D, Richet H, Reynaud A. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J Antimicrob Chemother*. 2000, 45:783-788
- Cattoir V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol Biol (Paris)*. 2004, 52:607-316
- Cayston, Résumé des caractéristiques du produit (RCP). Gilead Sciences. Disponible à l'adresse : <https://bijsluiters.fagg-afmps.be/registrationSearchServlet?key=EU/1/09/543/002&leafletType=rcp>

Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique - Vétérinaire (CBIPvet) : https://www.vetcompendium.be/fr/database?f%5B0%5D=type%3Acommentaar&f%5B1%5D=field_groep%3A1839. Consulté le 24 juillet 2021

Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique (CBIP) : <http://www.cbip.be/fr/chapters/12?frag=9449>. Consulté le 3 mai 2021

Centre of expertise on AntiMicrobial Consumption and Resistance in Animals (AMCRA), 2021. <https://formularium.amcra.be/classification.php>. Consulté le 24 juillet 2021

Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 2013, 5:58-65

Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, Denamur E, Gordon D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. Environ Microbiol. 2019, 21:3107-3117

Courvalin P, LeClercq R, Rice LB. Antibiogramme, Eska, 3ème édition, 2012, 800pp.

Cunningham SA, Vasoo S, Patel R. Evaluation of the Check-Points Check MDR CT103 and CT103 XL Microarray Kits by Use of Preparatory Rapid Cell Lysis. J Clin Microbiol. 2016, 54:1368-1371

da Costa PM, Loureiro L, Matos AJ. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. Int J Environ Res Public Health. 2013, 10:278-94

Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. Nature, 1965, 208:239-241

Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010, 74:417-433

Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique : <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000032251629/> Consulté le 27 avril 2021.

Diacou EL, Carfora V, Alba P, Di Matteo P, Stravino F, Buccella C, Dell'Aira E, Onorati R, Sorbara L, Battisti A, Franco A. Novel IncFII plasmid harbouring *bla_{NDM-4}* in a carbapenem-resistant *Escherichia coli* of pig origin, Italy. J Antimicrob Chemother. 2020, 75:3475-3479

Dierengezondheidszorg (DGZ), 2021. Antibioticaresistentie - evolutie 2017-2020 : Rundvee. Document lié : https://www.dgz.be/media/wutbp2iu/antibioticaresistentie-rundvee_2017-2020.pdf

Djebala S, Moula N, Bayrou C, Sartelet A, Bossaert P. Prophylactic antibiotic usage by Belgian veterinarians during elective caesarean section in Belgian blue cattle. *Prev Vet Med.* 2019, 172:104785. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.104785

Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard B, Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 2001, 147:1671-1676

Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC, Jacobs MR, Rice LB, Bonomo RA. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type beta-lactamase genes in Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol.* 2010, 48:2618-2622

Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. Traduit de l'allemand dans reviews of infectious diseases. 1988, 10:1220-1225

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2017. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Doi 10.2900/296939.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2020a. Antimicrobial consumption in the EU/EEA – Annual Epidemiological Report 2019. Document lié: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial-consumption-in-the-EU-Annual-Epidemiological-Report-2019.pdf>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2020b. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Document lié: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>

European Food Safety Authority (EFSA) et European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. EFSA Journal, 2020, 18:6007, 166 pp. DOI: [10.2903/j.efsa.2020.6007](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007)

Evans BA, Amyes SGB. OXA β-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2004, 27:241-263

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* 1929, 10:226-236

Frère J-M. β-Lactamases. Molecular anatomy and physiology of proteins. Nova sciences publishers, New York, 2012, 537 pp

Fridkin SK, Steward CD, Edwards JR, Pryor ER, McGowan JE Jr, Archibald LK, Gaynes RP, Tenover FC. Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States hospitals: project

ICARE phase 2. Project Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE). Clin Infect Dis. 1999, 29:245-252

Garcia-Graells C, Berbers B, Verhaegen B, Vanneste K, Marchal K, Roosens NHC, Botteldoorn N, De Keersmaecker SCJ. First detection of a plasmid located carbapenem resistant *blaVIM-1* gene in *E. coli* isolated from meat products at retail in Belgium in 2015. Int J Food Microbiol. 2020, 324:108624. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108624

Gasparrini AJ, Wang B, Sun X, Kennedy EA, Hernandez-Leyva A, Ndao IM, Tarr PI, Warner BB, Dantas G. Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. Nat Microbiol. 2019, 4:2285-2297

Giguère S., Prescott JF, Dowling PM. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. John Wiley & Sons, 5^{ème} édition, 2013, 683 pp

Gonzalez DD, Dus Santos MJ. Bovine colostral cells-the often forgotten component of colostrum. J Am Vet Med Assoc. 2017, 250:998-1005.

Gonzalez R, Elvira L, Carbonell C, Vertenten G, Fraile L. The Specific Immune Response after Vaccination against Neonatal Calf Diarrhoea Differs between Apparent Similar Vaccines in a Case Study. Animals (Basel). 2021, 11:1238. DOI: 10.3390/ani11051238.

Hamed RB, Gomez-Castellanos JR, Henry L, Ducho C, McDonough MA, Schofield CJ. The enzymes of β -lactam biosynthesis. Nat Prod Rep. 2013, 30:21-107

Hancock REW. The bacterial outer membrane as a drug barrier. Trends Microbiol. 1997, 5:37-42

Hasman H, Agersø Y, Hendriksen R, LinCavaco LM (DTU Food), Guerra-Roman B (external expert). Laboratory protocol of European Union: Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from caecal samples, version 7, 2019: https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/21-protocols/530_esbl-amc-cpeprotocol-version-caecal-v7-09-12-19.pdf

Jacoby GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009, 22:161-182

Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. J Clin Microbiol. 2015, 53:2410-2426

Joshi H, Jain V. Novel method to rapidly and efficiently lyse *Escherichia coli* for the isolation of recombinant protein. Anal Biochem. 2017, 528:1-6

Judicial Commission of the International Committee on Bacteriological Nomenclature. Conservation of the family name *Enterobacteriaceae*, of the name of the type genus, and designation of the type species. 1958, 8:73-74

- Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev.* 2017, 279:90-105
- Kliebe C, Nies B, Meyer J, Tolxdorff-Neutzling R, Wiedmann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985, 28:302-307
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mituashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983, 11:315-317
- Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013, 77:179-194
- Mader R, Damborg P, Amat JP, Bengtsson B, Bourély C, Broens EM, Busani L, Crespo-Robledo P, Filippitzi ME, Fitzgerald W, Kaspar H, Madero CM, Norström M, Nykäsenoja S, Pedersen K, Pokludova L, Urdahl AM, Vatopoulos A, Zafeiridis C, Madec JY; EU-JAMRAI. Building the European Antimicrobial Resistance Surveillance network in veterinary medicine (EARS-Vet). *Euro Surveill.* 2021, 26:2001359. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.4.2001359
- Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice1 LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012, 18:268-281
- Mainil JG, Fairbrother JM. Pathogenic Escherichia coli in domestic mammals and birds. In: Pathogenic *Escherichia coli*: Molecular and cellular microbiology. Morabito S. 1ère édition, Horizon Scientific Press et Caister Academic Press, Norwich, England, UK, 2014, 68 pp.
- Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical Veterinary Microbiology, 2^{ème} édition, Elsevier Ltd., 2013. 901 pp.
- Maynou G, Migura-Garcia L, Chester-Jones H, Ziegler D, Bach A, Terré M. Effects of feeding pasteurized waste milk to dairy calves on phenotypes and genotypes of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates before and after weaning. *J Dairy Sci.* 2017, 100:7967-7979
- McGuirk SM. Disease management of dairy calves and heifers. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2008, 24:139-153
- Mellmann A, Bletz S, Böking T, Kipp F, Becker K, Schultes A, Prior K, Harmsen D. Real-Time Genome Sequencing of Resistant Bacteria Provides Precision Infection Control in an Institutional Setting. *J Clin Microbiol.* 2016, 54:2874-2881

- Melo LC, Boisson MN, Saras E, Médaille C, Boulouis HJ, Madec JY, Haenni M. OXA-48-producing ST372 *Escherichia coli* in a French dog. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:1256-1258
- Mulvey MR, Bryce E, Boyd DA, Ofner-Agostini M, Land AM, Simor AE, Paton S. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:358-365
- Murugan MS, Sinha DK, Vinodh Kumar OR, Yadav AK, Pruthvishree BS, Vadhana P, Nirupama KR, Bhardwaj M, Singh BR. Epidemiology of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and first report of blaVIM carbapenemases gene in calves from India. *Epidemiol Infect.* 2019; 147:e159. DOI: 10.1017/S0950268819000463
- Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, Retailleau P, Iorga BI. Beta-Lactamase DataBase (BLDB) – *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017; 32:917-919
- Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. Identification of CTX-M-type extended-spectrum-beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:223-230
- Naas T, Vedel G, Poyart C, Nordmann. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49, 4423-4424
- Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist.* 2011; 17: 83–97
- Nugent ME, Hedges RW. The nature of the genetic determinant for the SHV-1 β-lactamase. *Mol Gen Genet.* 1979; 175:239-243
- O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance, 2016. Disponible à l'adresse suivante : https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- Ogutu JO, Zhang Q, Huang Y, Yan H, Su L, Gao B, Zhang W, Zhao J, Cai W, Li W, Zhao H, Chen Y, Song W, Chen X, Fu Y, Zhang F. Development of a multiplex PCR system and its application in detection of *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}* and *bla_{OXA-1}* group genes in clinical *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *J Antibiot (Tokyo)*. 2015; 68:725-733
- One Health initiative: <https://onehealthinitiative.com/about/> Consulté le 4 mai 2021.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). GLASS whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance. Geneva, 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Geneva, 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IG. Disponible à l'adresse : <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258970/9789241550130-eng.pdf;jsessionid=869ADAE104932EAFC87E6163C99B2CF8?sequence=1> Consulté le 10 mai 2021.

Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) : <https://www.oie.int/fr/ce-que-nous-faisons/initiatives-mondiales/antibioresistance/> Consulté le 3 mai 2021. Document lié : <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/antibio-en.pdf>

Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE). OIE annual report on antimicrobial agents intended for use in animals, fifth report. 2021 Document lié : https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_Fifth_Annual_Report_AMR.pdf

Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 2015, 119:1219-1233

Ota Y, Furuhashi K, Nagao Y, Nanba T, Yamanaka K, Ishikawa J, Nagura O, Iwaizumi M, Hamada E, Maekawa M. Detection of extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae using a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry based MBT STAR-BL software module with β -lactamase inhibition assay depends on the bacterial strains. *J Microbiol Methods.* 2019, 167:105734. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.105734.

Oviaño M, Gómara M, Barba MJ, Revillo MJ, Barbeyto LP, Bou G. Towards the early detection of β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017, 72:2259-2262

Philippon A, Dusart J, Joris B, Frère J-M. The diversity, structure and regulation of β -lactamases. *Cell Mol Life Sci.* 1998, 54:341-346

Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2004, 42:5715-5721

Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48:15-22

Pulss S, Stolle I, Stamm I, Leidner U, Heydel C, Semmler T, Prenger-Berninghoff E, Ewers C. Multispecies and Clonal Dissemination of OXA-48 Carbapenemase in *Enterobacteriaceae* From Companion Animals in Germany, 2009-2016. *Front Microbiol.* 2018, 9:1265. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01265

Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum SAFT, Huynen MA, Melchers WJG, van Schaik W, Wertheim HFL. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2017, 30:1015-1063

Quentin-Noury C. Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie. *Rev Francoph Lab.* 2016, 482:49-59

- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S. Concise review in veterinary microbiology. John Wiley & Sons Ltd, 2^{ème} édition, 2016. 197 pp.
- Reber AJ, Donovan DC, Gabbard J, Galland K, Aceves-Avila M, Holbert KA, Marshall L, Hurley DJ. Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system I. Effects on monocyte lineage cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008(a), 123:186-196.
- Reber AJ, Donovan DC, Gabbard J, Galland K, Aceves-Avila M, Holbert KA, Marshall L, Hurley DJ. Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part II. Effects on neonatal lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008(b), 123:305-13
- Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, Hay SI, Jiwakanon J, Kakkar M, Kariuki S, Laxminarayan R, Lubroth J, Magnusson U, Thi Ngoc P, Van Boekel TP, Woolhouse ME. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2016, 110:377-380
- Roschanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U. Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in *Enterobacteriaceae*. *PLoS One*, 2014, 17:9-:e100956 DOI: 10.1371/journal.pone.0100956
- Roupas A, Pitton JS. R factor-mediated and chromosomal resistance to ampicillin in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1974, 5:186-191
- Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2018, 73:1121-1137
- Smith BP, Van Metre DC, Pusterla N. Large Animal Internal Medicine. 6^{ème} édition. Mosby-Saunders, 2019, 1949pp
- Société Française de Microbiologie, CASFM /EUCAST, 2021. Document lié : https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2021/04/CASF2021_V1.0.AVRIL_2021.pdf
- Société Française de Microbiologie, CASFM-VET /VetCAST, 2020. Document lié : https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/09/CASF_VET2020.pdf
- Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet*. 2015, 16:472-482
- Speksnijder DC, Mevius DJ, Bruschke CJ, Wagenaar JA. Reduction of veterinary antimicrobial use in the Netherlands. The Dutch success model. *Zoonoses Public Health*. 2015, 62 Suppl 1:79-87
- Sun J, Liao XP, D'Souza AW, Boolchandani M, Li SH, Cheng K, Luis Martínez J, Li L, Feng YJ, Fang LX, Huang T, Xia J, Yu Y, Zhou YF, Sun YX, Deng XB, Zeng ZL, Jiang HX, Fang BH, Tang YZ, Lian XL, Zhang RM, Fang ZW, Yan QL, Dantas G, Liu YH. Environmental remodeling of human gut

microbiota and antibiotic resistome in livestock farms. *Nat Commun.* 2020, 11:1427. DOI: 10.1038/s41467-020-15222-y

Sykes RB, Matthew M. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1976, 2:115-157

Talaro KP, Chess B. Foundations in microbiology. McGraw-Hill education, New York, 10^{ème} edition, 2018. 879 pp.

Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2010, 8:207-217

Touchon M, Perrin A, de Sousa JAM, Vangchhia B, Burn S, O'Brien CL, Denamur E, Gordon D, Rocha EPC. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 2020, 16: e1008866. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008866

Tracz DM, Boyd DA, Bryden L, Hizon R, Giercke S, Van Caeseele P, Mulvey MR. Increase in *ampC* promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT-PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2005, 55:768-772

Tracz DM, Boyd DA, Hizon R, Bryce E, McGeer A, Ofner-Agostini M, Simor AE, Paton S, Mulvey MR; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2007, 270:265-271

Wax RG, Lewis K, Salyers AA, Taber H. Bacterial Resistance to Antimicrobials, 2^{ème} édition, CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, 2008. 430 pp.

Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott's Microbiology. McGraw-Hill Education, 10^{ème} édition, 2017, 996 pp.

Yigit H, Queenan A-M, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, 45:1151-1161

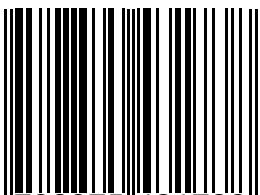
Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterisation of a new metallo- β -lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009, 53:5046-5054

Zhou Z, Alikhan NF, Mohamed K, Fan Y; Agama Study Group, Achtman M. The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res.* 2020, 30:138-152

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2021/0480/7
ISBN 978-2-87543-173-8



9 782875 431738

A standard linear barcode is positioned vertically. Below the barcode, the numbers 9 782875 431738 are printed, likely representing the ISBN or a related identifier.