



HAL
open science

Résistances et méthodes alternatives

Nathalie Ruaux

► **To cite this version:**

| Nathalie Ruaux. Résistances et méthodes alternatives . 2017. anses-01802740

HAL Id: anses-01802740

<https://anses.hal.science/anses-01802740>

Submitted on 29 May 2018

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

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

LES
CAHIERS
DE LA
RECHERCHE

Santé, Environnement, Travail

Résistances et méthodes alternatives
Comprendre où en est la recherche

OCTOBRE 2017

Édition scientifique

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger



Éditorial

L'une des propriétés de la vie est son extraordinaire pouvoir d'adaptation à des agressions, pouvoir qui se manifeste à l'échelle de l'individu, avec des mécanismes de défense multiples, mais aussi à celle des populations, avec des mécanismes de sélection des individus les plus résistants. C'est ainsi que les micro-organismes (bactéries, champignons, parasites, virus) évoluent quand ils sont exposés à des substances antimicrobiennes, telles que les antibiotiques, antifongiques, anthelminthiques ou antiviraux. On sait depuis la fin des années 1950 que les facteurs génétiques qui déterminent la résistance bactérienne peuvent se transmettre d'une espèce à l'autre. Parallèlement, l'apparition de résistances à des produits insecticides a également été démontrée chez les insectes. La conséquence de l'acquisition de ces caractères de résistance est une perte d'efficacité de l'arsenal thérapeutique et une augmentation globale des risques en matière de santé publique.

Les résistances apparaissent chaque fois que l'Homme tente de lutter contre une espèce nuisible ou pathogène, que ce soit par le biais de médicaments (à usage humain ou vétérinaire) ou par l'usage de produits phytopharmaceutiques ou biocides, pour protéger des cultures ou assainir un environnement contaminé. Les résistances se développent d'autant plus que l'usage de telles substances devient intensif, régulier et répété – ce qui a pour effet de donner un avantage compétitif permanent aux individus résistants. Certaines bactéries sont même devenues « multirésistantes » comme les entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre large (ex. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Ponctuel au départ, ce phénomène de résistance s'est généralisé avec l'usage de produits biocides ou antimicrobiens. Ainsi, de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques se manifestent et se développent à l'échelle mondiale, conduisant parfois à des impasses thérapeutiques.

La lutte contre l'antibiorésistance a pris un nouveau tournant en 2011, avec une mobilisation croissante au niveau français autour du *Plan national d'alerte sur les antibiotiques* lancé par le ministère chargé de la santé. Dans les élevages agricoles, outre le risque de transmission inter-espèces de bactéries résistantes, se pose également la question des pertes économiques dues à l'absence de traitements efficaces. Décrite à la fin de l'année 2015, la résistance à la colistine¹ nécessite par exemple de prendre des mesures adaptées dans tous les secteurs. Cette substance est en effet utilisée en médecine vétérinaire contre les infections causées par les entérobactéries chez les porcs et les volailles, mais elle est aussi utilisée en médecine humaine comme traitement de dernier recours contre des infections à des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes. L'importance croissante de la résistance aux antimicrobiens a conduit la 68^{ème} Assemblée mondiale de la santé de l'Organisation mondiale de la santé à élaborer un Plan d'action mondial contre ce fléau. Cinq objectifs stratégiques ont été définis : « *Mieux faire connaître et comprendre le problème de la résistance aux antimicrobiens, renforcer les connaissances et les bases factuelles par la surveillance et la recherche, réduire l'incidence des infections, optimiser l'usage des agents antimicrobiens, garantir des investissements durables pour combattre la résistance aux antimicrobiens* ».

Un autre volet de la lutte contre les maladies infectieuses est lié aux vecteurs qui propagent les agents pathogènes. De nombreux insectes, tels les moustiques, sont à l'origine de cette propagation (ex.

¹ Cf. Jean-Yves Madec, *La résistance à la colistine*, pp. 36-39.

chikungunya, dengue, maladie à virus Zika, paludisme) qui connaît une recrudescence importante dans les départements français d’Outre-mer et touche également l’hexagone, justifiant la mise en place d’une surveillance renforcée. Le développement, voire la réémergence, de ces maladies vectorielles en France pose de manière aiguë la question de la résistance des insectes porteurs (vecteurs) vis-à-vis des stratégies de lutte anti-vectorielle.

Que ce soit par ses activités d’expertise, de recherche et de référence, ou par le financement de projets de recherche en santé environnementale et en santé au travail, l’Anses entend agir au quotidien pour accroître les connaissances sur les phénomènes de résistance, au cœur du concept « *One health*, une seule santé ». J’espère que ce numéro des « Cahiers de la recherche » vous permettra de mieux appréhender cette problématique, et je vous en souhaite une excellente lecture.

Dr Roger GENET
Directeur général Anses

Retrouvez les Cahiers de la Recherche sur le site de l'Agence !

<https://www.anses.fr/fr/content/les-cahiers-de-la-recherche>

ajoutez à vos favoris en les ajoutant à la barre de favoris. [Importer mes favoris maintenant...](#)

Accueil > Les cahiers de la recherche

Les cahiers de la recherche

En matière de recherche, les financements d'État dans le cadre du programme de Travail (PNR EST) dans ce domaine, elle a contribué à la thématique "Radiofréquences et santé" et un projet est lancé chaque année.

Cette édition des *Cahiers de la recherche* est la première sur le thème "Radiofréquences et santé". Elle laisse apparaître les retombées du fort investissement des chercheurs dans ce domaine avec l'émergence de nouvelles idées et les premiers résultats. Elle souligne également un autre point positif pour une agence comme l'Anses : l'émergence d'une communauté de recherche avec des acteurs confirmés mais aussi, chaque année, de nouveaux entrants qui apportent de nouvelles techniques et des idées nouvelles.

► Consulter notre dernier numéro : [Cahier de la recherche n°9 : "Radiofréquences et santé" \(pdf\)](#)

Anciens numéros :
[Cahier de la recherche n°8 : "Regards sur 10 ans de recherche. Le PNR-EST, de 2006 à 2015" \(pdf\)](#)

<https://www.anses.fr/fr/content/les-cahiers-de-la-recherche>

Avertissement à l'attention des lecteurs



Les fiches de présentation des projets de recherche reflètent les points de vue des équipes scientifiques partenaires et n'engagent ni les Ministères de tutelle ou l'Anses et les partenaires associés. Pour toute question, les contacts sont indiqués à la fin de chaque fiche.



Sommaire

La lutte anti-vectorielle.....	5
La recherche d'une ou plusieurs alternatives à la deltaméthrine.....	10
Résistance aux pyréthrinoïdes chez <i>Aedes aegypti</i>	13
Une nouvelle formulation de Bti (biopesticide).....	16
L'efficacité des principaux répulsifs contre les moustiques les plus dangereux.....	18
Développement d'un test rapide mesurant l'exposition de l'homme aux piqûres d' <i>Aedes albopictus</i>	21
L'attraction exercée par la flore microbienne de la peau sur le moustique tigre.....	24
La phyto-pharmacovigilance des résistances.....	26
La résistance aux néonicotinoïdes chez le puceron vert du pêcher.....	29
Antibiorésistance.....	32
La résistance à la colistine.....	36
Les souches d' <i>Escherichia coli</i> résistantes aux antibiotiques.....	40
Les bactéries <i>E. coli</i> résistantes aux C3G chez les poussins.....	42
La dissémination des gènes d'antibiorésistance par la chaîne alimentaire.....	44
Dissémination d'antibiorésistance liée aux amendements organiques.....	47
Utilisation d'invertébrés aquatiques pour la surveillance des milieux aquatiques.....	50
<i>Pseudomonas</i> Vs <i>Legionella</i>	53
La résistance aux anthelminthiques des strongles gastro-intestinaux.....	56
Le suivi des antibiotiques en élevages.....	59
Glossaire.....	62
Mentions légales.....	68



La lutte anti-vectorielle

Les principales maladies à transmission vectorielle en France incluent des arboviroses transmises par des moustiques (par ex. *Aedes Aegypti* et *Aedes Albopictus*), des parasitoses (par ex. bilharziose, paludisme) et des infections transmises par des tiques (par ex. borréliose de Lyme).

Ces dernières années ont vu la réémergence de ces maladies. D'après l'OMS, elles représentent au niveau mondial plus de 17% des maladies infectieuses et « provoquent plus d'un million de décès chaque année »².

Certaines maladies à transmission vectorielle affectent uniquement les êtres humains (par ex. paludisme). Mais beaucoup d'entre elles sont des zoonoses, qui peuvent être transmises à l'Homme et à l'animal (ex. maladie de Lyme, infection à virus West Nile, leishmaniose...). Elles sévissent, le plus souvent, dans les régions tropicales et subtropicales. Mais le changement climatique, ainsi que la généralisation des déplacements humains intercontinentaux et du commerce international, les interactions de l'homme avec son environnement (ex. modifications des pratiques agricoles, urbanisation...) contribuent à propager ces maladies dans des régions qui en étaient jusqu'alors exemptes. En France, des épisodes épidémiques de maladies à transmission vectorielle ont eu lieu au cours des dix dernières années dans plusieurs départements et régions d'outre-mer et on a assisté à des émergences (par ex. Zika) dans la période récente. Des premiers cas de dengue³ et de chikungunya⁴ ont par ailleurs été détectés en métropole : d'où la mise en place toute récente d'un Plan national anti-dissémination du chikungunya et de la dengue en métropole, considérant la présence du moustique *Aedes albopictus* (ou moustique tigre) désormais présent dans trente départements de la France métropolitaine.



Aedes aegypti
(Auteur : James Gathany – CDC)



Aedes albopictus
(Auteur : James Gathany – CDC)

Les arboviroses : quelques exemples

Les maladies à arbovirus ou arboviroses sont un sous-ensemble des maladies vectorielles. Le mot arbovirus signifie d'ailleurs « *arthropod-borne virus* », c'est-à-dire virus transporté par des arthropodes. Appartiennent à cette catégorie par exemple, la dengue, le chikungunya et la maladie à virus Zika, qui sévissent par flambées épidémiques. Ces maladies peuvent être transmises à l'homme par les piqûres de moustiques femelles du genre *Aedes*.

² Organisation mondiale de la Santé, *Maladies à transmission vectorielle*, Aide-mémoire No 387, février 2016.

³ Une transmission locale a été rapportée pour la première fois en 2010.

⁴ À Montpellier, 4 cas d'infection par le chikungunya (contractée localement) ont été confirmés le 21 octobre 2014.

- **La dengue** (prononcez « *dingue* »), aussi appelée « *grippe tropicale* » se manifeste « *classiquement* » par l'apparition brutale d'une forte fièvre (>38,5°C.), accompagnée de maux de tête et de douleurs articulaires et musculaires. Surviennent également d'autres symptômes (ex. éruptions cutanées, nausées, vomissements) qui peuvent éventuellement s'intensifier pour des raisons méconnues et mettre en jeu le pronostic vital (au moins 2,5% des cas selon l'OMS). C'est l'arbovirose la plus répandue dans le monde.
- **Le chikungunya** (ou la maladie de celui « *qui marche courbé en avant* »⁵) provoque fièvre et douleurs articulaires (petites articulations des extrémités des membres, ex. poignet, doigt, cheville), qui peuvent être souvent invalidantes. À ces douleurs, s'ajoutent aussi des maux de tête, des douleurs musculaires et des éruptions cutanées.
- **La maladie à virus Zika** se manifeste par divers symptômes cliniques peu spécifiques, qui évoquent ceux de la grippe ou encore de la dengue ou du chikungunya. La maladie est le plus souvent bénigne⁶ mais elle peut, lorsqu'elle est transmise à une femme enceinte, provoquer des malformations sévères du fœtus (ex. microcéphalie). Parmi les autres complications liées à cette maladie figure le syndrome de Guillain-Barré. C'est pourquoi l'OMS a déclaré, le 1^{er} février 2016, que le virus Zika constituait une urgence de santé publique de portée internationale⁷.



*Moustiquaire au-dessus d'un lit
(Auteur : Tjeerd Wiersma – Amsterdam)*



Lutte anti-vectorielle, protection collective

Pour lutter contre ces maladies, il n'existe aujourd'hui ni vaccin commercialisé ni traitement antiviral spécifique. La prise en charge médicale repose sur des traitements anti-douleurs (antalgiques) et anti-inflammatoires qui permettent d'atténuer les symptômes douloureux, mais qui n'ont cependant aucun effet préventif sur l'apparition éventuelle d'une évolution chronique. Ainsi, la prévention contre les piqûres de moustiques reste la principale voie de contrôle de ce type de pathologies. Elle associe :

- **La protection individuelle** : elle vise à éviter les piqûres de moustiques. Des recommandations sont faites telles que porter des vêtements amples et couvrants (ex. manches longues, pantalons), appliquer des produits répulsifs adaptés sur la peau ou les vêtements (en suivant bien les instructions) et dormir sous des moustiquaires imprégnées d'insecticide.
- **La protection collective** : la lutte anti-vectorielle (LAV) vise à limiter la prolifération des moustiques. Elle repose à la fois sur l'élimination des gîtes larvaires potentiels (eau stagnante, par ex. pots de fleurs, récipients, pneus usagés) dans lesquels les moustiques peuvent déposer leurs œufs, et l'épandage d'insecticides, larvicides ou adulticides. D'autres moyens de lutte pour limiter la prolifération des

⁵ De la langue makondée (Afrique australe).

⁶ 70 à 80% des personnes infectées ne développent aucun symptôme.

⁷ Déclaration de l'OMS : <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/fr/>

moustiques, alternatifs aux insecticides, sont développés, faisant appel à des bactéries qui affectent les moustiques, ou des lâchers de moustiques rendus stériles (par modifications génétiques, ou encore par irradiation), néanmoins, ceux-ci en sont encore au stade des essais.



L'usage de substances insecticides en lutte anti-vectorielle

Pour être efficace et durable, ce type de LAV doit s'appuyer sur l'utilisation alternée de substances ayant des modes d'action différents, afin de limiter le développement des résistances aux insecticides chez les moustiques vecteurs. En effet, l'usage répétitif d'une même substance donne un avantage sélectif aux moustiques résistants qui peuvent proliférer. Toutefois, avec l'entrée en vigueur de la réglementation européenne⁸, l'encadrement des produits biocides (famille à laquelle appartiennent les insecticides) se fait progressivement. Diverses substances actives anciennement utilisées mais évaluées comme dangereuses pour l'Homme ou l'environnement se voient progressivement retirées du marché⁹.

Aujourd'hui, en France, très peu de substances actives larvicides et adulticides peuvent être utilisées en LAV. Les traitements s'organisent essentiellement autour d'une substance active ciblant les larves de moustiques (le *Bti*) et d'une substance active ciblant les moustiques adultes (la deltaméthrine). Or, l'usage massif de la deltaméthrine, sans alternance avec d'autres substances actives, a conduit à l'apparition de résistances avérées des moustiques dans les départements d'Outre-Mer. De plus, l'utilisation agricole et vétérinaire de cette molécule accentue cette problématique. Pour mener une LAV efficace à base d'insecticides, il est donc indispensable de disposer d'un panel plus large de substances actives. Bien que permis de façon exceptionnelle par la réglementation européenne, l'usage dérogatoire de substances ou de produits interdits ne semble plus être une stratégie adéquate et durable.

Dans ce contexte, l'Anses a entrepris depuis plusieurs années une recherche d'insecticides utilisables en LAV. Pour ce faire, en 2010, un inventaire des molécules ayant une activité connue ou supposée sur les diptères, les insectes piqueurs, voire certaines sur les moustiques, a été réalisé ; 129 substances ont ainsi été identifiées. Afin de sélectionner celles qui pourraient être effectivement utilisées, ces molécules ont ensuite été comparées selon des critères de toxicité, d'écotoxicité et de contamination de l'environnement – cette analyse aboutissant à la sélection de 32 substances actives (adulticides ou larvicides) potentiellement utilisables en LAV, au regard des usages connus¹⁰. Cette liste, actualisée en 2016, énumère les substances sur lesquelles la recherche et le développement¹¹ devraient plus particulièrement porter. En parallèle, l'Anses recommandait de développer des tests d'efficacité et des modèles destinés à estimer les expositions pour les opérateurs, pour la population et pour l'environnement, outils dédiés aux usages très particuliers de la LAV, de façon à faciliter une évaluation de risque précise et de comparer les différents produits. Pour un nombre réduit de substances actives adulticides potentiellement alternatives à la deltaméthrine, l'Anses a mené une évaluation des risques, qu'elle a publiée dans un avis en janvier 2017¹². Des travaux sont en cours pour vérifier l'efficacité de ces molécules.

Toutefois, l'Anses rappelle que les traitements adulticides doivent rester des moyens ponctuels destinés à éviter la propagation de la maladie autour des foyers de contamination dans un cadre bien défini. Ils constituent certes, un moyen de lutte contre la propagation des moustiques vecteurs de maladies mais ne peuvent à eux seuls constituer une solution unique de lutte anti-vectorielle. La lutte anti-vectorielle doit être raisonnée et durable, en s'appuyant sur une surveillance des vecteurs et des agents pathogènes et en

⁸ Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

⁹ Les raisons peuvent être un profil (éco)toxicologique qui ne satisfait pas aux exigences réglementaires ou parfois un désintérêt du fabricant pour soutenir ses produits.

¹⁰ Avis de l'Anses, 4 janvier 2013 : <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIOC2012sa0028Ra.pdf>

¹¹ Avis de l'Anses, 1^{er} février 2016 : <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIOC2015SA0169.pdf>

¹² Avis de l'Anses, 18 janvier 2017 : <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIOC2016SA0132.pdf>

cherchant à limiter le plus possible les effets indésirables. La durabilité de l'efficacité des substances actives passe par une stratégie préventive du développement des résistances par les moustiques vecteurs, en alternant les substances actives utilisées. Trois projets de recherche, présentés dans ce nouveau numéro des *Cahiers de la Recherche*, s'inscrivent directement dans la recherche de substances actives utilisables en LAV ou l'amélioration de formulations :

- La résistance aux pyréthriinoïdes chez le moustique tigre (*Aedes albopictus*) conduit à l'évaluation **de nouveaux candidats insecticides**. Dans le projet REAGIR¹³, cinq molécules (Bendiocarbe, chlorpyrifos-méthyl, dinotéfurane, clothianidine et éthiprole) ont ainsi été sélectionnées par l'équipe d'Isabelle Dusfour et ses partenaires, pour comprendre les mécanismes de résistance (notamment, la résistance croisée) et étudier le phénomène de réversion.
- À la Martinique, lors des premières épidémies de chikungunya (entre décembre 2013 et janvier 2015) et de Zika (entre décembre 2015 et septembre 2016), la forte résistance du moustique *Aedes aegypti* à la deltaméthrine¹⁴ est probablement l'un des facteurs de l'échec de la gestion des foyers initiaux de ces maladies. Le projet de recherche ADULTILAV proposé par Manuel Etienne s'inscrit dans le prolongement des travaux menés par l'Anses sur la recherche de molécules alternatives. Le projet consiste à **évaluer l'efficacité biologique** de des quatre candidats adulticides (bendiocarbe, chlorpyrifos-méthyl, dinotéfurane, imidaclopride). Les résultats préliminaires sont présentés dans ce numéro des Cahiers de la Recherche¹⁵.
- Dans le cadre de la lutte biocide, les traitements sont menés prioritairement contre les larves pour éviter la prolifération des moustiques vecteurs. L'observation de résistances chez certaines espèces de moustiques aux pesticides les plus couramment utilisés conduit au développement d'alternatives efficaces aux insecticides chimiques. L'insecticide d'origine bactérienne *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) est le biolarvicide le plus couramment utilisé. Néanmoins, son efficacité dépend de sa présence et de sa rémanence à la surface de l'eau qui reste faible ; aussi l'équipe de Gladys Massiera étudie avec ses partenaires **une nouvelle formulation du biopesticide Bti** (larvicide) pour une démoustication efficace et durable. C'est le projet MicroBti¹⁶.

Deux autres projets sont des recherches plus en amont visant à ouvrir de nouvelles pistes en LAV :

- Pour répondre à un réel besoin d'alternative aux pyréthriinoïdes, l'équipe d'Anna Cohuet et ses partenaires proposent une nouvelle stratégie de lutte ciblée contre les moustiques vecteurs les plus dangereux (*Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* et *An. Gambiae*) basée sur l'utilisation de produits répulsifs, tout en prenant en compte, de manière innovante, l'état physiologique du moustique : projet TARGET¹⁷.
- Récemment, le développement de l'écologie chimique a permis de formuler **de nouvelles hypothèses** pour expliquer le tropisme des moustiques vis-à-vis de l'homme. Dans ce contexte, l'équipe de Claire Valiente Moro et ses partenaires évaluent, dans un dispositif expérimental, le pouvoir attractant des substances émises par la flore microbienne de la peau afin de développer des stratégies innovantes en LAV : projet ATTRACTIGRE¹⁸.

La lutte anti-vectorielle n'est pas seulement biocide ; il convient qu'elle soit intégrée, c'est-à-dire associée à toutes les autres méthodes et ce, de manière complémentaire. L'évaluation de l'efficacité des actions de lutte

¹³ Cf. Isabelle Dusfour, *Résistance aux pyréthriinoïdes chez Aedes aegypti*, pp. 13-15.

¹⁴ Pyréthriinoïde.

¹⁵ Cf. Manuel Étienne, *La recherche d'une ou plusieurs alternatives à la deltaméthrine*, pp. 10-12.

¹⁶ Cf. Gladys Massiera, *Une nouvelle formulation de Bti (biopesticide)*, pp. 16-17.

¹⁷ Cf. Anna Cohuet et Cédric Penner, *L'efficacité des principaux répulsifs contre les moustiques les plus dangereux*, pp. 18-20.

¹⁸ Cf. Claire Valiente Moro, *L'attraction exercée par la flore microbienne de la peau sur le moustique tigre*, pp. 24-25.



La recherche d'une ou plusieurs alternatives à la deltaméthrine

Évaluation de l'efficacité en laboratoire et en semi-opérationnel de quatre candidats adulticides potentiellement utilisables en lutte antivectorielle sur Aedes aegypti et Culex quinquefasciatus à la Martinique.

Manuel ÉTIENNE

Mots-clés : vecteur, résistance, toxicité, la Martinique, lutte contre moustique, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, pyréthrianoïde, deltaméthrine, , alléthrine, imidaclopride, néonicotinoïde

À la Martinique, comme à la Guadeloupe et en Guyane, la présence de moustiques génère de lourds impacts d'ordre sanitaire et environnemental. Sur les vingt-trois espèces actuellement répertoriées, deux ont une forte affinité pour l'Homme et font peser un risque sur la santé et sur le bien-être de la population :

- *Aedes aegypti*, qui, en plus de la dengue transmise depuis les années 1990 dans l'île²⁰, s'est rendu successivement responsable de la première épidémie de chikungunya à la Martinique (14.500 cas estimés, 85 décès entre décembre 2013 et janvier 2015²¹) puis de la première épidémie de Zika (36.100 cas estimés dont 800 femmes enceintes, 34 complications neurologiques dont 29 syndromes de Guillain-Barré et un décès entre décembre 2015 et septembre 2016).
- *Culex quinquefasciatus*, qui est surtout responsable d'une forte nuisance puisqu'une étude sur son taux d'attaque a révélé que les résidents de certaines zones de l'île étaient exposés à plus de 200 piqûres/personne/nuit²².

La recherche d'alternatives

Bien que la lutte contre *Ae. aegypti* et *Cx. quinquefasciatus* fasse surtout appel à des traitements des gîtes larvaires et l'assainissement

des milieux, le recours à un traitement contre les moustiques adultes est aussi indispensable lorsqu'il s'agit de circonscrire un foyer de dengue, de chikungunya ou de Zika par le biais de pulvérisations à proximité ou dans les habitations. Or, ces deux espèces de moustiques ont développé une résistance à la plupart des insecticides, particulièrement à la deltaméthrine (pyréthrianoïde), seul adulticide dont l'usage est encore autorisé dans les pays de l'Union européenne. Les conséquences peuvent être majeures. Ainsi, la forte résistance d'*Ae. aegypti* à la deltaméthrine est probablement l'un des facteurs de l'échec de la gestion des foyers initiaux de chikungunya (décembre 2013) et de Zika (décembre 2015) à La Martinique.

“

*La forte résistance d'*Aedes aegypti* à la deltaméthrine est probablement l'un des facteurs de l'échec de la gestion des foyers initiaux de Chikungunya et de Zika à La Martinique.*

”

C'est dans ce contexte que les ministères de l'Écologie, de la Santé et du Travail ont saisi l'Anses pour identifier des insecticides potentiellement utilisables en lutte antivectorielle (LAV)²³. À l'issue des travaux d'expertise collective de l'Anses, trente-

Centre de Démoustication et de Recherches Entomologiques » (CEDRE) – La Martinique

²⁰ Après avoir assuré anciennement la transmission locale du virus de la fièvre jaune.

²¹ Source : Cire Antilles Guyane, 2015.

²² Yébakima, 1991.

²³ Saisine 3 juin 2009.

deux substances actives potentiellement utilisables contre les moustiques ont été proposées et classées en trois catégories :

- La classe A réunit les substances pour lesquelles les connaissances et données actuelles sont suffisamment robustes et étayées au niveau mondial ;
- Les classes B et C incluent des substances actives plus inédites en matière de lutte contre les moustiques (utilisées à titre expérimental ou sur d'autres espèces d'insectes). Pour celles-ci le niveau de connaissance doit être renforcé sur un ou plusieurs critères : efficacité, toxicité ou écotoxicité. Parmi celles-ci, quatre pourraient constituer une alternative à la deltaméthrine pour lutter contre les deux espèces de moustiques majeures de la Martinique (*Ae. aegypti* et *Cx. quinquefasciatus*) : l'alléthrine (pyréthrianoïde), l'indoxacarbe (oxadiazine), le dinotéfurane et l'imidaclopride (deux néonicotinoïdes).



Recherche
d'insecticides
potentiellement
utilisables
en lutte
antivectorielle

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2011 – Édition scientifique



Recherche d'insecticides potentiellement utilisables en LAV
(avis et rapport Anses, 2011)

Le projet de recherche : ADULTILAV

Le projet proposé s'inscrit dans le prolongement de ces travaux ; il prévoit l'évaluation de l'efficacité biologique de ces quatre candidats adulticides potentiellement utilisables en LAV.

Méthodologie

La première étape prévoit :

- l'échantillonnage de souches des deux espèces de moustiques provenant de différentes localités de l'île ;
- l'élevage de ces souches et la réalisation de premiers tests en laboratoire afin d'évaluer la sensibilité des larves et des adultes aux quatre substances candidates.

En ce qui concerne *Ae. aegypti*, l'évaluation de la sensibilité des larves a été menée selon le protocole standard OMS. En revanche, l'évaluation de la sensibilité des femelles adultes a été menée par le biais d'applications topiques (sur un point externe du corps) en lieu et place des tests standards. En effet, suite à des difficultés qui concernaient la qualité de l'imprégnation des papiers tests²⁴ par certaines substances actives (diluées dans une solution d'acétone/silicone) et l'absence de précision des doses d'imprégnation, il a en effet été nécessaire de modifier la méthode. L'efficacité d'une substance est indiquée par la concentration permettant d'éliminer 90% des moustiques.

Résultats préliminaires

On a comparé l'efficacité des quatre substances candidates sur les souches d'*Ae. aegypti* (larves ou adultes) présentes sur l'île avec celle observée sur les souches de laboratoires, exemptes de résistance. Le « ratio de résistance », c'est-à-dire le rapport des deux concentrations nécessaires pour tuer une même proportion (50, 90 ou 95%) d'individus respectivement sauvages puis sensibles, est une mesure de la résistance des souches présentes sur l'île. Par exemple pour la deltaméthrine, il faut multiplier les doses par 500 lorsqu'on passe d'une

²⁴ Ces tests standard consistent à placer les moustiques dans des tubes contenant des papiers imprégnés de la substance à étudier.

souche de laboratoire à une souche sauvage résistante. On a obtenu les ratios de résistance (RR90) suivants :

- Sur les larves : 3,1 pour le dinotéfurane – 4,5 pour l'alléthrine – 4,7 pour l'imidaclopride – 1257,1 pour l'indoxacarbe.
- Sur les femelles adultes : 0,8 pour le dinotéfurane – 1,8 pour l'imidaclopride – 2 pour l'indoxacarbe. Les données vis-à-vis de l'alléthrine sont en cours d'acquisition.

Donc, à l'exception du cas de l'indoxacarbe en test larvaire, tous les tests en laboratoire suggèrent des résistances très modérées des souches sauvages. Cette efficacité biologique acceptable en laboratoire est en attente de confirmation dans des conditions semi-opérationnelles : ce qui constitue la deuxième étape du projet.

Si au moins l'une de ces substances candidates pouvait voir cette efficacité biologique confirmée dans des conditions de terrain et présenter en outre un profil (éco)toxicologique favorable, les opérateurs (services) en charge de la démoustication pourraient envisager de disposer, à court terme, du très attendu biocide alternatif à la deltaméthrine.

Les partenaires :

Manuel ÉTIENNE

Centre de Démoustication et de Recherches Entomologiques » (CEDRE) – Collectivité Territoriale de La Martinique

Durée : 28 mois

Financement : 49.920 €

Contact :

MANUEL.ETIENNE@collectivitedemartinique.mq

Les tests de sensibilité (selon le protocole standard de l'OMS)

Face à la résistance aux insecticides des moustiques vecteurs de maladies, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a défini un protocole standard pour étudier la présence et l'évolution de cette résistance, en laboratoire. Des séries de tests de sensibilité peuvent être réalisées avec différentes substances actives sur des moustiques (larves ou adultes) afin d'évaluer leur efficacité à des doses différentes.

Concrètement, l'expérimentation est faite avec des cylindres test OMS, par contact des moustiques avec des papiers « témoins » et des papiers imprégnés à plusieurs concentrations d'insecticides. Ces concentrations correspondent généralement aux doses diagnostiques préconisées par l'OMS. Dans chaque tube, les moustiques restent en contact avec les papiers (« témoins » ou imprégnés) pendant une heure ; le nombre de moustiques « *knocked down* » est relevé régulièrement. Le temps KD 95 correspond par exemple à 95% de moustiques « *knocked down* ».

De la même manière, ces tests en laboratoire permettent de fournir des ratios de résistance (RR). Pour connaître, par exemple, le RR90, il s'agit de calculer le rapport, à l'issue de l'épreuve, entre la dose létale correspondant à 90% de mortalité chez les moustiques « sensibles » et la dose létale correspondant à 90% de mortalité chez les moustiques « résistants ».



Résistance aux pyréthriinoïdes chez *Aedes aegypti*

Résistance aux pyréthriinoïdes chez *Aedes aegypti* : évaluation de nouveaux candidats insecticides et étude du phénomène de réversion

Isabelle DUSFOUR

Mots-clés : moustique vecteur, *Aedes aegypti*, résistance aux insecticides, lutte antivectorielle, insecticide, pyréthriinoïde, organophosphoré, zika, dengue, chikungunya, Guyane, Nouvelle Calédonie

Après avoir touché l'île de la Réunion en 2005 et la Nouvelle-Calédonie en 2011, le chikungunya a fait son apparition dans les Antilles françaises à la fin de l'année 2013, puis a atteint la Guyane en 2014. L'expansion de ce virus menace l'ensemble de ces régions, qui subissent aussi régulièrement des épidémies de dengue. En outre, le virus Zika qui avait affecté plus de 30.000 personnes en 2013 dans la Polynésie française, a touché la Nouvelle-Calédonie²⁵ puis les Amériques en 2015.

Le principal vecteur de ces virus est le moustique *Aedes aegypti*, présent dans les zones tropicales et subtropicales. Les vaccins sont en cours de développement ou récents, et la prévention repose principalement sur la lutte anti-vectorielle (LAV). Elle s'organise donc autour de deux axes :

- La lutte larvicide qui cible les habitats larvaires (ex. citernes, récipients utilisés pour le stockage de l'eau) par l'utilisation de produits biocides et l'élimination mécanique de ces gîtes²⁶ ;
- La lutte adulticide qui cible les moustiques au stade adulte (ex. pulvérisations spatiales à l'intérieur ou à proximité des habitations).

Cependant, une forte réduction de l'efficacité des traitements chimiques a été observée à l'échelle mondiale. En Guyane et en Nouvelle-Calédonie, la résistance d'*Ae. aegypti* aux pyréthriinoïdes (ex. deltaméthrine) compromet, par exemple, la lutte contre les maladies à transmission vectorielle.

Dès qu'une résistance aux insecticides est détectée, un plan de gestion de celle-ci doit être mis en place afin de restaurer ou maintenir l'efficacité des produits ou substances disponibles. Pour cela, l'utilisation raisonnée des pulvérisations ou encore l'utilisation concomitante ou alternée de molécules (dont les modes d'action sont différents) sont préconisées. Cette procédure évite que l'application de toujours la même molécule mène à la sélection de populations de moustiques résistantes.

La recherche de nouvelles alternatives insecticides

Dans le cadre de la lutte anti-vectorielle en Europe, peu ou pas d'alternatives adulticides aux pyréthriinoïdes existent. Ainsi, rechercher de nouvelles alternatives insecticides pour lutter contre les populations d'*Ae. aegypti* résistantes est devenu une priorité.

- **En Guyane** : une forte résistance à la deltaméthrine a été enregistrée avec des mortalités inférieures à 25% en 2013 selon les protocoles de l'OMS. Bien qu'*Ae. aegypti* soit particulièrement résistant aux pyréthriinoïdes, les services de démoustication ne sont autorisés à utiliser que des molécules de cette famille pour lutter contre les moustiques adultes. Dans ce contexte, une demande d'usage dérogatoire a été formulée auprès des autorités sanitaires pour disposer d'insecticides alternatifs tels que des

Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne

²⁵ Premier cas diagnostiqué en mars 2016.

²⁶ D'une part, l'élimination mécanique des gîtes larvaires est limitée ; elle ne peut pas être pratiquée dans des sites difficiles d'accès. D'autre part, l'utilisation de larvicides dans des réserves d'eau (notamment, à usage domestique) peut être considérée avec suspicion. C'est pourquoi elle n'intervient qu'en complément de la lutte adulticide.

organophosphorés lors de l'épidémie de Chikungunya.

- **En Nouvelle-Calédonie** : la résistance à la deltaméthrine s'est aggravée depuis 2003 suite aux épidémies d'arboviroses, sans toutefois atteindre les niveaux observés en Guyane. En effet, les services de démoustication peuvent utiliser en alternance deux familles d'insecticides (pyréthrinoïdes et organophosphorés²⁷) et limiter la généralisation des phénomènes de résistance. Cependant, cette situation est devenue précaire par le risque d'interdiction du malathion²⁸ suite à de nombreuses controverses autour, notamment, des pratiques dérogatoires et donc par l'utilisation d'une molécule unique.

“ Il devient urgent de développer des molécules alternatives aux pyréthrinoïdes avec un risque acceptable pour la population et l'environnement. ”

Ainsi il devient urgent, dans ce contexte, de développer des molécules alternatives avec un risque acceptable pour la population et l'environnement.

Le projet de recherche : REAGIR

Le projet vise tout d'abord à identifier de nouvelles substances actives contre les populations d'*Ae. aegypti* résistantes aux pyréthrinoïdes en ciblant particulièrement le stade adulte.

Trouver ces alternatives adulticides passe soit par le criblage de molécules d'origine naturelle ou synthétique, nouvelles ou existantes dans d'autres domaines, soit par l'amélioration de l'efficacité d'insecticides connus. Pour cela, la liste des molécules criblées s'appuie sur le rapport d'expertise collective de l'Anses (janvier 2013)²⁹.

Méthodologie

Dix molécules ont été évaluées sur une lignée de moustiques sensibles à tout insecticide (élevée en laboratoire) et sur des souches résistantes (issues du terrain) provenant de la Guyane et de la Nouvelle-Calédonie. Selon la méthode des tests en tube de l'OMS, plusieurs doses ont été utilisées pour évaluer leur activité insecticide.

D'autre part, pour comprendre les mécanismes de la résistance (notamment, la résistance croisée³⁰), cinq insecticides ont été sélectionnés : bendiocarbe, chlorpyrifos-méthyl, dinotéfurane, clothianidine et éthiprole³¹.

Enfin, des travaux seront menés pour savoir si la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Ae. aegypti* est réversible. C'est un élément important, voire incontournable, de la gestion et de l'amélioration de la LAV. Or, aucune donnée n'étant disponible sur cette possibilité de réversion (aussi bien en laboratoire que sur le terrain), des questions persistent sur l'évolution de celle-ci dans le cas d'un changement d'insecticide.

Ainsi, lorsqu'un nouvel insecticide non impacté par la résistance est mis en application, il agit à la fois via une sélection des individus porteurs de résistance mais aussi en éliminant les individus résistants à d'autres molécules comme les pyréthrinoïdes.

²⁷ Contrairement à la Guyane, la Nouvelle-Calédonie n'est pas soumise aux directives européennes et l'usage des organophosphorés n'y est pas interdit.

²⁸ Composé organophosphoré.

²⁹ Anses, *Hiérarchisation des insecticides potentiellement utilisables en lutte anti-vectorielle (LAV)*, édition scientifique, janvier 2013.

³⁰ Savoir si la résistance à une famille d'insecticides entraîne la résistance à une autre famille d'insecticides, malgré des modalités d'action différentes.

³¹ Le bendiocarbe appartient à la famille chimique des carbamates, le chlorpyrifos-méthyl à celle des organophosphorés ; le dinotéfurane et la clothianidine à la famille des néonicotinoïdes. L'éthiprole est un composé actif possédant des propriétés insecticides.

La caractérisation de ce phénomène permettra de mieux anticiper, d'une part, les variations de la résistance aux pyréthrinoïdes et, d'autre part, le développement éventuel de la résistance aux nouvelles molécules. Cette tâche se poursuit actuellement.

Les partenaires :

Isabelle DUSFOUR

Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne

Jean-Philippe DAVID

Université Joseph Fourier, LECA, UMR 5553, Grenoble

Fabrice CHANDRE

IRD, UMR MIVEGEC, Montpellier

Nicolas POCQUET

Institut Pasteur de la Nouvelle-Calédonie, Nouméa

Durée : 38 mois

Financement : 199.449 €

Contact : jdusfour@pasteur-cayenne.fr

Les vecteurs

Les vecteurs sont des organismes vivants capables de transmettre des maladies infectieuses d'un hôte vertébré (animal ou homme) à un autre. Il s'agit principalement d'arthropodes hématophages qui, lors d'un repas de sang, ingèrent des micro-organismes pathogènes (ex. bactérie, parasite, virus) présents dans un hôte porteur et, à l'issue d'une période de cinq à quinze jours, les transmettent ensuite à un nouvel hôte à l'occasion du repas suivant.

Parmi les insectes et acariens hématophages, seuls quelques-uns sont susceptibles d'être des vecteurs. Les plus connus sont les moustiques mais il en existe d'autres comme les phlébotomes (moucherons), les mouches, les tiques, les poux, les puces, etc.

Une nouvelle formulation de Bti (biopesticide)

Formulation flottante de biopesticide pour une démoustication efficace et durable

Gladys MASSIERA

Mots-clés : *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, biopesticide, insecticide, lutte contre moustique, larve, capsule, méthode alternative, accumulation, eau, vecteur

Depuis quelques années, une nouvelle espèce de moustique, *Aedes albopictus*, a atteint le sud de la France. Elle peut transmettre différentes maladies à l'homme comme le chikungunya ou la dengue, à l'image d'autres espèces de moustiques (*Aedes aegypti*, *Aedes polynensis*) présentes sur d'autres territoires français : Caraïbes, Guyane, Polynésie. Aussi, la démoustication est-elle principalement motivée par un objectif de santé publique.



De nombreux moyens de lutte à l'encontre de ces espèces nuisibles ont été mis en place comme l'utilisation de répulsifs, de barrières physiques (ex. moustiquaires imprégnées d'insecticides) ou d'insecticides chimiques. Ces méthodes de lutte n'agissent pas toutes sur la même phase de développement des insectes³².

Le Bti, insecticide d'origine bactérienne

L'observation de résistances chez certaines espèces de moustiques aux pesticides synthétiques les plus couramment utilisés (organophosphorés ou pyréthrinoïdes) a conduit à l'utilisation et au développement d'alternatives efficaces aux insecticides chimiques³³. Ainsi, l'insecticide d'origine bactérienne *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) est devenu pratiquement la seule substance active autorisée pour le traitement des gîtes larvaires de moustiques en milieu naturel en France métropolitaine.

Plusieurs conditions sont nécessaires pour que des cristaux de Bti agissent après ingestion par un moustique. Les cristaux sont composés de plusieurs types de protéines dont quatre principales qui ne se dissocient qu'en milieu basique, ce qui est le cas du système digestif des larves. Pour être activées, elles nécessitent, de plus, l'action des enzymes notamment digestives de la larve. L'association de ces protéines en adhésion sur la membrane des cellules du tissu de l'appareil digestif conduit à la formation de pores puis à la mort des larves. L'action toxique du Bti est donc très sélective ; elle n'a pas d'impact sur les autres insectes ni sur les vertébrés.

Les produits commerciaux à base de Bti se présentent sous quatre formes : poudres, granules, briquettes et liquides. Le choix de la formulation à employer dépend de l'insecte visé, du type d'environnement à traiter et de son accessibilité. Il reste des marges de progrès.

Laboratoire Charles Coulomb, UMR 5221, Université de Montpellier

³² Les moustiques sont des insectes qui passent par quatre phases de développement : œuf, larve, nymphe et adulte. Les trois premières sont aquatiques, la dernière aérienne.

³³ Directive biocide 98/8/CE.

Si le Bti est un biolarvicide intéressant, son efficacité dépend de sa présence et de sa rémanence à la surface de l'eau, c'est-à-dire là où les larves de moustiques se nourrissent, exclusivement pour certaines espèces anophèles. Or, la densité du Bti est telle que ce pesticide sédimente après son application, en quelques jours. Les traitements doivent donc être répétés et conduisent à l'accumulation du produit actif dans l'environnement.

“

Si le Bti est un biolarvicide intéressant, son efficacité dépend de sa présence et de sa rémanence à la surface de l'eau.

”

Le projet de recherche : MicroBti

Le projet de recherche consiste à étudier deux stratégies de formulation qui permettraient de prolonger la présence de Bti à la surface de l'eau au-delà de quelques jours (à l'exception des eaux usées), pour le traitement des gîtes larvaires :

1. La première consiste à préparer des microparticules de cire grâce auxquelles les particules submicroniques de Bti sont piégées. Cette méthode fait l'objet de développements récents mais, jusqu'à présent, il ne semble pas qu'elle ait été utilisée pour formuler des insecticides. Une autre originalité de ce travail est que le nombre de constituants de la formulation est limité à la cire et le produit actif minimisant ainsi son coût.
2. La deuxième repose sur l'encapsulation de Bti : des microgouttes d'une suspension de Bti sont encapsulées dans une coque d'huile ou de monomères, et rendue solide par changement de température. Ces capsules, qui demandent encore à être mises au point (ex. choix du composé d'enrobage) présenteront l'avantage de protéger le Bti des ultraviolets du soleil. En effet, ceux-ci ont tendance à réduire l'activité larvicide des cristaux de Bti.

Les deux stratégies sont complémentaires - l'objectif étant de prolonger l'action du biolarvicide de 1-2 semaines à 10-12 semaines. À terme, l'objectif final du projet est de mettre sur le marché une formulation de Bti efficace et durable sur les gîtes naturels ; après avoir évalué son efficacité sur site, cette formulation sera optimisée pour rendre son utilisation plus simple et pratique.

Les partenaires :

Gladys MASSIERA et Martin IN

Laboratoire Charles Coulomb, UMR 5221, Université de Montpellier

Fabrice CHANDRE et Frédéric DARRIET

Institut de Recherche pour le Développement, UMR MIVEGEC, Montpellier

Durée : 28 mois

Financement : 178.048 €

Contact : Gladys.Massiera@umontpellier.fr

L'efficacité des principaux répulsifs contre les moustiques les plus dangereux

Nouvelle stratégie de lutte ciblée contre les vecteurs les plus susceptibles de transmettre des pathogènes
Anna COHUET et Cédric PENNETIER

Mots-clés : lutte contre moustique, arbovirose, paludisme, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, résistance, pyréthriinoïde, méthode alternative, arbovirus, moustique, insecticide, répulsif

Pour lutter contre les maladies qui peuvent être transmises par piqûres de moustiques, les stratégies de lutte anti-vectorielle se heurtent à une même limite : un arsenal chimique à disposition particulièrement restreint.

- **En cas d'épidémie d'arbovirose :** la lutte contre les moustiques adultes *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* (dont le pic d'agressivité est diurne) repose sur des pulvérisations spatiales d'insecticides qui appartiennent le plus souvent, pour des raisons d'innocuité pour l'homme, à la famille des pyréthriinoïdes. Cependant, *Ae. aegypti* est largement résistant à cette famille d'insecticides et les risques de développement de résistances sont à craindre chez *Ae. albopictus*.
- **Dans la lutte contre le paludisme :** les femelles *An. gambiae*, quant à elles, piquent principalement la nuit. Il est donc possible de se protéger avec des moustiquaires imprégnées elles-aussi avec des insecticides qui appartiennent à la famille des pyréthriinoïdes.

Un besoin d'alternatives

L'usage massif des pyréthriinoïdes à des fins de santé publique et surtout en agriculture a entraîné la sélection de moustiques résistants, ce qui compromet l'efficacité des campagnes de lutte anti-

vectorielle (LAV). Outre une moindre efficacité, ces insecticides présentent d'autres inconvénients comme leur impact sur l'environnement, notamment leur toxicité pour les insectes non ciblés. De tout cela résulte un rapport coût/efficacité incertain et une mauvaise acceptabilité dans certains contextes. Comme l'a souligné l'avis de l'Anses de janvier 2013³⁴, il existe donc un réel besoin d'alternatives aux insecticides pour la protection contre les piqûres de moustiques les plus susceptibles de transmettre des pathogènes (ex. arbovirus, parasite).

Les principaux répulsifs

Parmi ces alternatives, il y a les produits répulsifs. Si leur utilisation a été jusqu'à présent limitée essentiellement aux voyageurs, leur usage pourrait s'élargir. En effet, au cours des dernières années, l'offre commerciale pour ces substances s'est élargie, avec des substances naturelles (ex. huiles essentielles de plantes ou leurs extraits) ou synthétiques (ex. DEET, IR35-35, KBR 3023, PMDRBO³⁵) mais leur efficacité n'est pas toujours prouvée. La récente réglementation biocide³⁶ tente d'encadrer au mieux l'évaluation de ces substances répulsives, mais les études rigoureuses utilisant des protocoles pertinents et standardisés sont encore trop rares, si bien que leur utilisation demeure aujourd'hui encore largement empirique.

Or, la résistance aux insecticides, répandue chez la plupart des moustiques vecteurs, est suspectée d'in-

Unité MIVEGEC, Montpellier

³⁴ Anses, *Hiérarchisation des insecticides potentiellement utilisables en lutte anti-vectorielle (LAV)*, avis et rapport d'expertise collective, janvier 2013.

³⁵ Substances actives : DEET (N₁,N-diéthyl-m-toluamide), IR35-35 (N-acétyl-N-butyl-β-alaninate d'éthyle), KBR3023 (Carboxylate de Sec-butyl 2-(2-hydroxyéthyl) pipéridine-1/Icaridine), PMDRBO (mélange de cis- et trans-p-menthane-3,8 diol).

³⁶ Directive biocide 98/8/CE.

teragir avec l'efficacité des répulsifs. Des données préliminaires ont montré, par exemple, une efficacité moindre du DEET chez des anophèles comme *An. gambiae* déjà résistants par ailleurs aux pyréthrinoïdes.

Le projet de recherche : TARGET

Le projet consiste à évaluer les principaux répulsifs d'intérêt autorisés par la réglementation biocide, à étudier leur efficacité et leurs modes d'action chez trois espèces vectrices de pathogènes (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* et *An. gambiae*), tout en prenant en compte, de manière innovante, l'état physiologique du moustique.



En effet, le moustique vecteur devient infectieux et donc dangereux lorsque les pathogènes ont achevé leur période d'incubation. Ceci est particulièrement vrai pour les vecteurs de *Plasmodium*³⁷ ; on considère que les sporozoïtes (le stade parasitaire qui infecte de nouveaux hôtes) atteignent les glandes salivaires du vecteur environ deux semaines après que celui-ci ait été infecté, alors que la durée de vie du moustique est de l'ordre de trois semaines. Ainsi, seuls les moustiques âgés sont capables de transmettre des *Plasmodium*. Ceci est aussi vrai pour les vecteurs d'arbovirus (*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*), en particulier dans des climats modérés comme en Europe. La question est de savoir si ces

moustiques âgés pourraient donc avoir une sensibilité aux répulsifs différente de celle des moustiques jeunes et ainsi répondre de manière différente aux formulations répulsives.

Dans la plupart des contextes de transmission, on peut considérer que la très grande majorité des moustiques infectieux³⁹ a eu au moins une expérience de repas de sang sur l'humain (le repas les ayant infectés), éventuellement en présence d'un répulsif. Des données suggèrent ainsi une efficacité diminuée du DEET, chez *Ae. aegypti*, après un premier contact ; ce qui reste à démontrer avec d'autres espèces de moustiques et avec d'autres molécules répulsives.

Il faut également prendre en compte le fait que les moustiques infectieux ont un comportement modifié par l'infection. Ils sont susceptibles de voir leur agressivité augmentée lorsque les pathogènes sont présents dans les glandes salivaires ; ils sont aussi plus sensibles à certains stress. Une conséquence est que les évaluations de répulsifs sur des moustiques non infectés pourraient potentiellement sous/sur-évaluer leur efficacité sur la transmission.

La résistance aux insecticides, l'âge, l'expérience et le statut infectieux sont autant de composantes rarement considérées dans l'étude du comportement des moustiques vecteurs et négligées lors de l'évaluation des répulsifs. L'originalité du projet consiste donc à se focaliser, de manière expérimentale, sur les moustiques les plus dangereux (résistants aux pyréthrinoïdes, âgés, expérimentés dans la prise de sang même en présence d'un répulsif et à un stade infectieux) en élaborant des stratégies de LAV plus ciblées, efficaces et durables.

Méthodologie

En plus des quatre répulsifs recommandés (DEET, IR35-35, KBR 3023, PMDRBO) en application cutanée contre les vecteurs de dengue et chikungunya, deux composés synthétiques de plantes, le géraniol et le citronellal (identifiés pour leurs activités répulsives potentielles) seront aussi évalués.

³⁷ Parasite à l'origine du paludisme.

³⁹ La transmission dite « verticale », c'est-à-dire la transmission d'une femelle infectée à sa descendance, est selon les pathogènes considérés ici nulle ou si faible qu'elle ne contribue que de manière anecdotique à la transmission.

Les tests de comportement chez les différentes espèces devraient mettre en évidence des corrélations entre la réponse des moustiques à certaines molécules répulsives et leurs états physiologiques. De plus, des techniques mesureront la réponse des neurones olfactifs contenus dans une sensille³⁸ à des molécules odorantes pour les combinaisons molécules/états physiologiques qui se révéleront pertinentes au fil du projet. Pour mieux comprendre cette corrélation entre l'état physiologique et la réponse comportementale aux répulsifs, nous allons également nous intéresser au système olfactif des moustiques qui est responsable de la perception des odeurs. Nous utiliserons des techniques d'électrophysiologie pour mesurer la réponse des neurones olfactifs contenus dans une sensille à des molécules répulsives pour les différents états physiologiques.

Les partenaires :

Anna COHUET et Cédric PENNETIER

Unité MIVEGEC, Montpellier

Laurent DORMONT

CEFE-CNRS, Interactions Biotiques, Montpellier

Amanan Alphonsine KOFFI

Institut Pierre Richet (IPR), Bouaké, Côte d'Ivoire

Durée : 40 mois

Financement : 199.264 €

Contact : anna.cohuet@ird.fr

³⁸ Poil situé sur les antennes.

Développement d'un test rapide mesurant l'exposition de l'homme aux piqûres d'*Aedes albopictus*

Développement d'un test rapide mesurant l'exposition de l'homme aux piqûres d'Aedes albopictus : contribution à l'évaluation du risque vectoriel et application à l'évaluation de l'efficacité des stratégies de lutte anti-vectorielle

Anne POINSIGNON

Mots-clés : exposition, insecte, dengue, résistance, chikungunya, arbovirus, Sud de la France, pesticide, substance active, biocide, insecticide, *Aedes albopictus*, moustique, biomarqueur

L'expansion rapide et l'implantation durable du moustique tigre (*Aedes albopictus*) en France métropolitaine et dans les territoires d'outre-mer font craindre le déclenchement de foyers épidémiques d'arboviroses telles la dengue, le chikungunya et la fièvre Zika. En l'absence de traitements ou de vaccins efficaces, la lutte anti-vectorielle (LAV) est la seule méthode envisageable pour contrôler ce risque et diminuer les densités de moustiques du genre *Aedes*.

Toutefois, les méthodes de surveillance entomologique mises en œuvre par les services de santé (ex. cartographie des gîtes larvaires d'*Ae. albopictus*, piégeage des moustiques femelles adultes...) ont des limites importantes, en particulier quant à leur déploiement à grande échelle et leur fiabilité. Comment évaluer avec précision l'exposition humaine aux risques de transmission d'arbovirus, en particulier au niveau individuel ?

Mise au point d'un nouveau test

Pour mesurer l'exposition humaine aux piqûres d'*Aedes albopictus*, la mise au point d'un nouvel outil sérologique pourrait représenter, sur le terrain, une alternative intéressante aux méthodes entomologiques actuelles. Cet indicateur s'appuie sur la détection dans le sang humain des anticorps (Ac) dirigés spécifiquement contre des protéines de la salive d'*Aedes*. La présence de ces Ac indique une

exposition passée de l'individu. Ce test peut aussi être utilisé pour tester l'efficacité de la lutte anti-vectorielle. Une diminution du taux de ces anticorps⁴⁰ serait associée à une réduction du contact homme-*Aedes* et donc à une bonne efficacité des méthodes de LAV.

Le projet de recherche : Exp-Albo

L'objectif principal du projet consistait à identifier et à valider un biomarqueur d'exposition aux piqûres d'*Ae. albopictus*.

Méthodologie et Résultats

La première étape consistait à évaluer le potentiel biomarqueur de candidats salivaires dans le contexte d'exposition en France métropolitaine au moment du projet (exposition récente et saisonnière). Une approche immuno-protéomique, couplée à des analyses bio-informatiques, a permis d'identifier la protéine salivaire de 34 kDa comme meilleur candidat⁴¹ et d'en sélectionner trois sous-parties ou peptides : chez *Ae. aegypti* (« peptide *Aedes* 1 ») et chez *Ae. albopictus* (« peptides *Aedes* 2 et 3 ») d'après leurs caractéristiques d'immunogénicité⁴² et de spécificité aux *Aedes* (permettant ainsi de mesurer uniquement l'exposition aux *Aedes*). Devant la difficulté à mettre en évidence la présence d'Ac spécifiques à ces 3 peptides candidats, l'étude s'est orientée vers la validation de la réponse Ac spécifique de la salive totale d'*Ae. albopictus* comme

⁴⁰ Préalablement validés comme biomarqueurs d'exposition aux piqûres d'*Aedes*.

⁴¹ Spécifique au genre *Aedes* et immunogène chez les populations humaines.

⁴² Capacité à induire une synthèse d'anticorps : les personnes piquées ont-elles développé des anticorps anti-peptides ?

biomarqueur d'exposition dans ce contexte métropolitain.

Cette étape a confirmé la colonisation de nombreux territoires (ex. Corse, PACA, Languedoc-Roussillon) par *Aedes albopictus* par la mise en évidence d'une réponse anticorps spécifique à la salive d'*Ae. albopictus* détectée chez 54% des personnes testées⁴³. Celles résidant dans les régions colonisées depuis plus longtemps par *Ae. albopictus* présentaient une réponse IgG⁴⁴ plus élevée que ceux résidant en Midi-Pyrénées⁴⁵ et dans des régions non colonisées (ex. Auvergne, Loire). Toutefois, une variabilité importante du niveau de réponse d'un individu à l'autre a été notée, y compris à l'intérieur d'une même région.



Aedes albopictus femelle
(Source : Michel Dukhan – IRD⁴⁶)

La validation des peptides salivaires *Aedes* 1 et 2 comme outils permettant d'évaluer l'efficacité des stratégies de LAV⁴⁷ a ensuite été entreprise. Des individus adultes naturellement exposés aux piqûres d'*Ae. albopictus* présentaient une réponse spécifique au peptide salivaire *Aedes* 1 dont le niveau a diminué de façon significative après la mise en place d'une LAV, indiquant la pertinence de cet outil sérologique pour l'évaluation de l'efficacité des stratégies de lutte. Bien que ce test soit standardisé et robuste, sa mise en œuvre nécessite deux jours, certains équipements et un personnel qualifié.

L'étape suivante a donc consisté à développer ce biomarqueur sous la forme d'un test plus rapide et simple d'utilisation, de type « bandelette auto-réactive », particulièrement adapté aux conditions de terrain et acceptable par les populations (utilisable à partir d'une simple goutte de sang prélevée par exemple au bout du doigt). Aussi appelé POC (de l'anglais, *point of care*), il s'agit d'un test immuno-chromatographique à flux latéral sur bandelette conditionnée sous un format cassette. Il met en œuvre un principe proche de celui des tests de grossesse. Le test se révèle négatif lorsqu'une seule bande colorée apparaît au niveau de la zone de contrôle (prouvant que le dispositif a bien fonctionné) ou se révèle positif lorsqu'en plus de la bande contrôle, une bande colorée clairement visible apparaît au niveau de la zone test.

“ Un tel outil pourra être utilisé sur le terrain pour tester l'efficacité de la lutte anti-vectorielle. ”

Le prototype a été développé en utilisant des sérums identifiés positifs en ELISA présentant ainsi des Ac IgG spécifiques au peptide salivaire candidat *Aedes* 1. L'objectif était d'obtenir un signal traduisant une réponse qualitative de l'exposition (absence/présence) et/ou dont l'intensité reflète la quantité d'IgG humaines dirigées contre le peptide candidat (réponse quantitative ou semi-quantitative). Différents développements ont permis de définir les conditions optimales¹⁰ et la réduction du temps de réalisation du test d'une heure à trente minutes. Mais sur l'ensemble des sérums testés, seuls 40% des individus positifs en ELISA se sont révélés aussi positifs en « bandelette ». Le test bandelette actuel paraît donc moins sensible que la méthode ELISA de référence.

⁴³ Échantillon de 247 individus sélectionnés par tirage au sort.

⁴⁴ L'immunoglobuline G est une des protéines du système immunitaire ; elle est plus connue sous le nom d'anticorps.

⁴⁵ Un seul département colonisé à partir de 2012.

⁴⁶ Photothèque : www.indigo.ird.fr

⁴⁷ Mises en place précédemment sur l'île de la Réunion.

Une optimisation de la bandelette et une étude à plus grande échelle avec des échantillons plus frais restent nécessaires pour améliorer et valider le prototype et également tester ses performances (sensibilité, rapidité, portabilité, stabilité, robustesse).

La disponibilité d'un tel outil est d'intérêt pour la santé publique. Il pourra être utilisé sur le terrain par les opérateurs publics de démoustication et leur fournira une estimation individuelle et en temps réel de l'efficacité de la LAV sur le contact homme-*Aedes*, sans passer par une analyse ultérieure en laboratoire.

Publications issues de ce projet

Human IgG Antibody Response to Aedes Nterm-34kDa Salivary Peptide, an Epidemiological Tool to Assess Vector Control in Chikungunya and Dengue Transmission Area. Elanga Ndille E, Doucoure S, Poinsignon A, Mouchet F, Cornelie S, D'Ortenzio E, DeHecq JS, Remoue F. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Dec 1;10(12):e0005109.

doi: [10.1371/journal.pntd.0005109](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005109) 

Les partenaires :

Anne POINSIGNON, Franck REMOUE, Emmanuel Elanga N'DILLE et Denis BOULANGER

UMR MIVEGEC IRD 224-CNRS 5290-Université Montpellier

David PIQUEMAL et Bernadette TRENTIN

ACOBION, Montpellier

Période : du 31 octobre 2013 au 31 mars 2016

Financement : 49 K€

Contact : anne.poinsignon@ird.fr

L'attraction exercée par la flore microbienne de la peau sur le moustique tigre

La microflore cutanée comme source de molécules attractantes pour le moustique tigre Aedes albopictus : application au développement de stratégies innovantes en lutte anti-vectorielle

Claire VALIENTE MORO

Mots-clés : insecte, moustique, *Aedes albopictus*, résistance traitement, bactérie, peau, pesticide, insecticide, méthode alternative, kairomone

Selon l'Agence Européenne pour l'Environnement (EEA), le moustique tigre *Aedes albopictus* est l'une des espèces invasives ayant un impact potentiel sur la santé avec des risques sanitaires préoccupants ; ce moustique serait capable de transmettre plus de vingt agents pathogènes humains dont les virus du chikungunya, de la dengue, de la fièvre jaune, de la fièvre du Nil occidental, etc.

Pour limiter le risque d'importation et d'implantation des maladies transmises par ce moustique, le ministère de la santé a élaboré un plan national anti-dissémination du chikungunya et de la dengue. Il s'agit de développer la lutte anti-vectorielle⁴⁸, dont les objectifs sont de surveiller et limiter l'implantation et la progression du moustique. Les moyens mis en œuvre sont la suppression des gîtes larvaires et la lutte contre les moustiques adultes au moyen de traitements insecticides chimiques et/ou biologiques. L'une des difficultés rencontrées est que les insecticides dont l'usage est autorisé au niveau communautaire ont montré leurs limites, compte tenu de l'apparition de résistances. Endiguer les épidémies de maladies émergentes et résurgentes transmises par les moustiques serait plus facile si des méthodes alternatives pour éradiquer les moustiques étaient développées.

Le tropisme des moustiques

L'évolution des populations de moustiques dépend de différents facteurs (alimentaire, non alimentaire, reproductif) qui vont conditionner à la fois leur comportement et leur écologie. Parmi eux, les odeurs, l'olfaction étant le principal sens par lequel les moustiques localisent leurs hôtes cibles. Récemment, le développement de l'écologie chimique a permis de formuler de nouvelles hypothèses pour expliquer le tropisme des moustiques vis-à-vis de l'homme. Il semblerait que les sensilles chémoréceptrices (organes sensoriels) au niveau des antennes répondent, chez certains insectes hématophages (y compris les moustiques), à divers composés organiques volatils présents sur la peau de l'homme et dans sa sueur (ex. ammonium, acide lactique...) qui agiraient comme des *stimuli*.

Jusqu'à présent, les études menées dans ce domaine ont principalement porté sur deux espèces de moustiques : *Anopheles Gambiae* et *Aedes aegypti*⁴⁹ qui répondraient de manière similaire à un spectre commun de stimuli chimiques.

Le projet de recherche : ATTRACTIGRE

Des travaux récents explorent l'attraction exercée par les vertébrés sur les moustiques pour développer des leurres à molécules sémiochimiques⁵⁰ pour la surveillance (on les utilise pour piéger les moustiques à des fins de comptage) et le contrôle des

Université Claude Bernard Lyon 1, UMR 5557, Écologie microbienne

⁴⁸ C'est-à-dire de lutter contre les moustiques, vecteurs de la maladie.

⁴⁹ Ces deux espèces de moustiques sont à haut degré d'affinité pour l'Homme.

⁵⁰ C'est-à-dire des molécules qui sont interprétées par le moustique comme un signal.

populations de ces vecteurs. Dans ce contexte, le projet proposé a pour ambition d'évaluer une approche innovante de lutte spécifique contre le moustique vecteur *Ae. albopictus*.

Méthodologie

Récemment, l'application des techniques de séquençage haut-débit a révélé la complexité de la communauté microbienne de la peau humaine. Sa composition, fortement corrélée à l'odeur émise, est unique pour chaque individu.

Pour diversifier la collection d'isolats bactériens et favoriser l'identification de molécules auxquelles les moustiques sont sensibles, douze volontaires adultes⁵¹ habitant le territoire français ont été sélectionnés, avec une répartition égale homme/femme. Parmi eux certains se disaient attractifs et d'autres peu attractifs pour les moustiques. Des prélèvements ont été effectués sur trois zones : bras, aisselle et pied. Puis chaque prélèvement a ensuite étéensemencé dans différents milieux de culture (généraliste et sélectifs). L'ADN extrait à partir de 149 colonies bactériennes isolées a ensuite été identifié par séquençage. Cela a mené à sélectionner 46 isolats choisis comme représentatifs du panel d'échantillonnage d'origine :

- 50% appartenaient au phylum des Firmicutes (dont une majorité de bactéries appartenant au genre *Staphylococcus*) ;
- 41,3% au phylum des Actinobacteria dont les genres *Corynebacterium* et *Propionibacterium* ;
- 8,7% à la classe des Gammaproteobacteria.

Afin d'évaluer le pouvoir attractant des substances émises par ces isolats bactériens vis-à-vis du moustique tigre, 18 isolats sur les 46 ont été testés et différents indices (attractivité, spécificité, activité) ont été calculés. Parmi les substances émises, le 3-méthyl butanol et le 2-méthyl butanol sont significativement plus produits par les isolats attractifs.

Le pouvoir attractif de ces substances a ensuite été testé dans un dispositif expérimental reproduisant

l'habitat naturel des moustiques tigres. Une molécule dite « non-attractive » : l'isobutyrate d'isobutyle, a été utilisée comme référence. Deux lieux identiques ont été aménagés ; des orchidées et des bambous ont été disposés dans ces mésocosmes pour servir de sites de repos mais également de source de nourriture et un bassin a également été aménagé pour servir de site de ponte. Les expérimentations sur les molécules d'intérêt ont été réalisées à la dose de 10 µL et un temps d'observation de 22h maximum pour se rapprocher des conditions de piégeages en milieu naturel.

Résultats

Pour les essais réalisés avec le 2-méthyl butanol, seul un moustique a été piégé après 24h et de manière non reproductible. Concernant les essais réalisés avec le 3-méthyl butanol, seuls deux moustiques sur 180 ont été piégés. Il n'est donc pas possible, dans ces conditions expérimentales, de conclure quant à un effet significativement attractif de ces deux molécules. Toutefois, les expérimentations en cours visent à optimiser les conditions de réalisation des tests en faisant varier certains paramètres, notamment la densité de population, le placement des pièges (et leur nature) et la dose de produit apportée.

Une fois les conditions validées, les molécules qui auront montré la plus grande efficacité seront évaluées *in situ*, en collaboration avec l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication.

Les partenaires :

Claire VALIENTE MORO

Université Claude Bernard Lyon 1, UMR 5557, Écologie microbienne

Gilles COMTE

Université Claude Bernard Lyon 1, UMR 5557, Écologie microbienne, Centre d'Études des Substances Naturelles (CESN), Villeurbanne

Durée : 27 mois

Financement : 119.964 €

Contact : CLAIRE.VALIENTE-MORO@adm.univ-lyon1.fr

⁵¹ Ce nombre de sujets est compatible avec la diversité attendue de la microflore cutanée et des COV associés.



La phyto-pharmacovigilance des résistances

Les points forts et les faiblesses potentielles de la phyto-pharmacovigilance des résistances en France
R4P (Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides)

Mots-clés : surveillance, suivi, résistance traitement, système de pharmacovigilance, cartographie, produit phytosanitaire

Les bio-agresseurs des végétaux (principalement les champignons, les insectes, et les adventices) évoluent des résistances en réponse aux pressions de sélection exercées par les produits phytosanitaires. Dans un contexte de réduction de la diversité des produits autorisés, il est devenu essentiel de suivre, de manière plus rigoureuse, l'émergence et la fréquence de ces résistances dans les populations de bio-agresseurs des plantes cultivées en France et en Europe. D'autant plus que la mise au point de nouvelles substances actives est devenue rare et que les méthodes dites alternatives ne permettent pas encore de s'affranchir de la lutte chimique.

Depuis le début des années 2000, il existe en France un dispositif de surveillance pour la détection et le suivi des résistances des bio-agresseurs aux produits phytosanitaires. Ce système de surveillance mobilise plusieurs structures institutionnelles (DGAL, Anses, Inra), mais il n'existe pas, pour l'instant, d'harmonisation du suivi des résistances aux produits phytosanitaires à l'échelle européenne. Or, aujourd'hui, les volumes des échanges commerciaux et, plus généralement, l'intensité des activités humaines entraînent un accroissement des mouvements des bio-agresseurs pathogènes et, par conséquent, des souches résistantes. Ainsi devient-il nécessaire d'œuvrer à l'harmonisation des réglementations et des méthodes de suivi des résistances aux produits phytosanitaires en Europe. Il est crucial que la détection des phénomènes de résistances soit la plus précoce possible. En effet, plus la découverte des résistances est tardive, plus la mise en œuvre de stratégies en vue de limiter l'extension de ces résistances sera difficile et plus le risque de traitements inutiles et/ou inadaptés sera grand.

L'objectif du projet « Phyto-pharmacovigilance des résistances » consiste (i) à évaluer le fonctionnement du dispositif de surveillance des résistances en France et à le comparer à celui d'autres pays de l'Union européenne et (ii) à développer de nouvelles méthodes et de nouveaux outils sur des thématiques émergentes en résistance. Cette étude permettra de proposer des axes d'amélioration de la vigilance à l'échelon national et des pistes pour une harmonisation à l'échelle européenne. Ce projet s'inscrit également dans le nouveau dispositif de phyto-pharmacovigilance, qui a été confié à l'Anses et qui a pour objectif principal une surveillance transversale des signaux faibles en lien avec les effets non intentionnels des produits phytosanitaires.

Une phase primordiale dans la surveillance des résistances est **la vérification des observations** qui remontent du terrain et qui font état d'inefficacités de traitements en les imputant à d'éventuelles résistances. En effet, les inefficacités relevées peuvent être la conséquence de nombreux facteurs ne relevant pas d'un problème de résistance. Pour cela, il est nécessaire d'étudier les individus (ou les populations) suspect(e)s en laboratoire. Différentes approches sont utilisées. Il existe en particulier des méthodes de test biologique qui permettent de mesurer des phénotypes de résistance. Lorsqu'une résistance est caractérisée, il est par la suite possible d'utiliser des méthodes moléculaires qui permettent de caractériser les génotypes des individus.

Tests biologiques

En matière de résistance, le premier paramètre à connaître pour pouvoir démontrer l'existence d'une résistance est **la sensibilité de base** d'une population

de bio-agresseurs. Pour chaque couple bio-agresseur/matière active, obtenir cette donnée nécessite la mise en œuvre d'une étude spécifique qui doit permettre de :

- Choisir la méthode d'analyse la plus appropriée à la biologie du bio-agresseur et au mode d'action du produit ;
- Définir les critères de concentration de toxique qui inhibe 50% (CI 50) et 100% (CI 100) de l'activité biologique du bio-agresseur considéré.

Un exemple de test biologique à mettre en place préalablement au suivi de la résistance est en développement ; il concerne *Drosophila suzukii*, une espèce de mouche qui s'attaque en particulier aux petits fruits et aux cerises. Afin d'évaluer le niveau de résistance de différentes populations de *D. suzukii* vis-à-vis des produits phytosanitaires, des **tests biologiques par contact** ont été effectués pour deux substances actives, le phosmet (organophosphoré) et la lambda-cyhalothrine (pyréthrianoïde). Lors de ces tests, les mouches sont en contact avec l'insecticide *via* leurs tarses pendant une durée limitée et la dose létale induisant 50% de mortalité (DL₅₀) d'une population ou d'une souche est déterminée. Ces méthodes permettront de surveiller l'évolution de la sensibilité des populations de *D. suzukii* à ces deux produits phytosanitaires.



Drosophila suzukii mâle
(Auteur : Martin Cooper, Ipswich, UK)

Méthodes moléculaires

Un des mécanismes de résistance courant est lié à **la présence de mutations** dans le gène codant pour la protéine cible des produits phytosanitaires.

Lorsqu'une résistance a été identifiée par un test biologique et qu'un lien avec une mutation a pu être démontré, on peut utiliser un test de biologie moléculaire. À titre d'exemple, citons le cas de *Plasmopara viticola* (agent pathogène responsable du mildiou de la vigne), pour lequel des tests biologiques ont permis d'identifier des souches résistantes vis-à-vis d'un fongicide au mode d'action assez récent⁵⁶. Après séquençage du gène codant pour la protéine cible, la mutation responsable de cette résistance a pu être identifiée. Ceci a permis de développer une nouvelle méthode de détection de cette résistance par génotypage. Cette méthode permettra de surveiller plus facilement la répartition et la fréquence de cette résistance au sein des populations de l'agent pathogène.

Le développement de nouvelles technologies de séquençage à haut-débit permet aussi d'identifier les mutations en cause dans une résistance. C'est une approche qui a été développée dans le cas de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS chez le séneçon. Cette approche a pour avantage de permettre non seulement l'identification de l'ensemble des mutations sur le gène étudié, mais également l'évaluation de la fréquence des différents allèles dans les populations échantillonnées.

Surveillance et cartographie

Concernant par exemple la lutte chimique contre la pyrale du maïs, des premiers échecs de traitements phytosanitaires ont été signalés, entre 2008 et 2011, dans les départements du Loiret, Loir-et-Cher et de l'Eure-et-Loir. Tandis que la résistance aux pyréthrianoïdes était confirmée en laboratoire, des phénomènes de résistance de moindre intensité étaient également détectés en Alsace. En 2014, de nouveaux essais en laboratoire ont permis de comprendre les mécanismes moléculaires de cette

⁵⁶ Inhibiteurs externes de la quinone en position distale (QoI-D, de l'anglais « *Quinone outside Inhibitors* - Distal).

résistance, dus à une combinaison de résistances métabolique⁵² et de cible⁵³. Grâce au marqueur moléculaire développé à l'Inra d'Avignon, il s'agit désormais de mieux cerner l'ampleur du phénomène en réalisant une cartographie de l'aire de répartition française de la mutation « kdr » en grande partie responsable de la résistance de la pyrale du maïs aux pyréthriinoïdes.

Le génotypage de 1413 pyrales du maïs a été réalisé dans 19 départements français. La fréquence globale de l'allèle de résistance a été estimée à 13%, mais seulement 7% des individus génotypés avaient un phénotype résistant (*ie.* homozygote pour l'allèle résistant). Il est intéressant de noter que 93% de ces individus résistants sont situés à proximité immédiate du foyer initial d'apparition de la résistance (Binas, Loir-et-Cher). Ces informations permettent d'avoir une vision plus fine de la réalité sur le terrain et d'adapter les recommandations de gestion spécifiques de la résistance département par département.

Études des mécanismes

Lorsque les bio-agresseurs résistants ont été mis en évidence sur le terrain et les résistances vérifiées par un plan de surveillance, il est essentiel d'en comprendre les mécanismes sous-jacents. L'étude et la compréhension des mécanismes sont indispensables pour la mise au point et l'amélioration des méthodes moléculaires (souvent moins lourdes et plus rapides que les tests biologiques, dont l'utilisation est impérative tant que la base génétique des résistances n'est pas connue). De plus, la compréhension des mécanismes et la surveillance de l'évolution des allèles⁵⁴ impliqués permettent d'adopter les stratégies les mieux adaptées à la lutte contre le développement des résistances aux produits phytosanitaires. En complément des projets cités ci-dessus, deux études sont en cours sur les mécanismes de résistance d'une part, de l'oïdium de la vigne aux fongicides et, d'autre part, du puceron vert du pêcher aux néonicotinoïdes⁵⁵.

Au travers de ces exemples concrets, apparaissent les différentes étapes de développement des tests et méthodes d'analyses nécessaires à la surveillance des résistances aux produits phytosanitaires. Les résultats de ces études permettront de renforcer la surveillance des phénomènes de résistances. À terme, l'objectif est de participer activement à la mise en place de ce futur système de référence en France et en Europe.

Les partenaires :

Benoit BARRÈS et Lucile BLOUQUY

Anses, Laboratoire de Lyon - Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires (RPP)

Marie-France CORIO-COSTET

UMR SAVE, INRA, Villenave d'Ornon

Christophe DÉLYE

UMR Agroécologie, INRA, Dijon

Jacques GROSMAN

DRAAF-SRAL Auvergne-Rhône-Alpes, Lyon

Pauline De JERPHANION

Anses, Laboratoire de Lyon - Unité de Coordination et d'Appui à la Surveillance (UCAS)

Brigitte MEUNIER

UMR 9198, I2BC, CNRS, Gif-sur-Yvette

Myriam SIEGWART et Lucile BLOUQUY

UMR PSH, INRA, AGROPARC, Avignon

Durée : 30 mois

Financement Anses : 203 K€ dans le cadre de la [phytopharmacovigilance](#)

Contacts : benoit.barres@anses.fr

⁵² Surexpressions d'enzymes de détoxification.

⁵³ Mutation dans le gène du canal sodium de type « *knock-down resistance* » (ou « kdr »).

⁵⁴ Variante d'un gène.

⁵⁵ Cf. Benoit Barrès et Claire Mottet, *La résistance aux néonicotinoïdes chez le puceron vert du pêcher*, pp. 29-31.



La résistance aux néonicotinoïdes chez le puceron vert du pêcher

Niveau de dominance de la résistance aux néonicotinoïdes chez le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*)

Benoit BARRÈS et Claire MOTTET

Mots-clés : puceron vert, *Myzus persicae*, résistance insecticide, néonicotinoïde, gène résistance, allèle, mutation

Les déterminants génétiques à l'origine des phénomènes de résistances aux pesticides sont divers. Différents mécanismes de résistances ont été répertoriés dont notamment ceux causés par des modifications des protéines cibles (on parle alors de résistance de cible) ou encore ceux liés à un niveau d'expression d'enzymes de détoxifications plus élevé (on parle alors de résistance métabolique⁵⁷). Mieux connaître ces déterminants génétiques et leur(s) impact(s) sur les niveaux et le spectre de résistance est essentiel dans l'établissement de stratégie de lutte contre ces résistances. Le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*, est un insecte polyphage, c'est-à-dire qu'il est capable de se nourrir sur plusieurs espèces végétales. Dans le cas de *M. persicae*, plus de 400 plantes hôtes ont été identifiées, que ce soient des espèces sauvages ou cultivées comme le pêcher, le colza, la pomme de terre et la betterave. Il occasionne des dégâts directs (ex. flétrissement des feuilles, souillures) qui peuvent affecter le rendement et la qualité des récoltes, voire les rendre impropres à la commercialisation. Il est aussi et surtout le vecteur de maladies virales qui peuvent avoir un impact très important sur les cultures (ex. la jaunisse occidentale de la betterave [BWYV] ou le virus de la Sharka [PPV] sur pêcher).

La lutte chimique contre cette espèce a donc été utilisée très tôt après-guerre. En réaction à ces pressions de sélection, des résistances successives

ont évolué chez *M. persicae* vis-à-vis de toutes les grandes familles de pesticides développées au cours des soixante-dix dernières années. En France, les résistances de cible aux carbamates et aux pyréthriinoïdes sont très fréquentes, y compris en combinaison au sein de mêmes individus. La famille de pesticides la plus récente contre laquelle *M. persicae* a évolué une résistance dite « de cible » est la famille des néonicotinoïdes.

Une résistance de cible

Normalement, l'insecticide agit en inhibant, modulant ou en exacerbant le fonctionnement d'une protéine dont le rôle est vital pour l'animal. Une mutation peut causer une résistance de cible, c'est à dire que la protéine est modifiée, de telle sorte que l'insecticide ne peut plus interférer avec elle. Ce mécanisme peut être très efficace, en diminuant de milliers de fois l'efficacité de l'insecticide. C'est le cas, par exemple, de l'allèle⁵⁸ mutant « Mace »⁵⁹ qui rend le puceron résistant aux carbamates. De plus, on a observé que la très grande majorité des pucerons résistants aux carbamates se sont aussi révélés résistants aux pyréthriinoïdes⁶⁰, d'où l'utilisation, depuis les années 1990, de néonicotinoïdes pour essayer de contrôler ce ravageur de manière plus efficace.

Les néonicotinoïdes sont des insecticides neurotoxiques qui s'attaquent aux récepteurs de

Anses, Laboratoire de Lyon – Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires (RPP)

⁵⁷ Ces deux types de résistance sont décrits dans le précédent article sur *La résistance aux insecticides chez le puceron vert du pêcher* dans les Cahiers de la Recherche, No. 3, octobre 2013, pp. 24-26.

⁵⁸ Variante d'un gène.

⁵⁹ Abréviation qui signifie en anglais : « *Modified acetylcholinesterase* », responsable d'une perte de sensibilité aux carbamates.

⁶⁰ Des mutations (appelées kdr ou super-kdr) modifient des protéines membranaires des neurones impliquées dans la propagation de l'influx nerveux et rendent le puceron résistant aux pyréthriinoïdes.

l'acétylcholine⁶¹. Le puceron vert du pêcher (*M. persicae*) a également évolué vis-à-vis de ce groupe d'insecticides, si bien qu'il tolère aujourd'hui des doses bien au-delà des doses létales pour un individu sensible. Cette résistance de cible a été décrite pour la première fois sur un clone échantillonné dans le sud-est de la France. Mais de nombreuses questions restent en suspens concernant cette résistance. Nous nous sommes intéressés à deux aspects qui ont potentiellement un impact important sur la stratégie de gestion des résistances :

- l'allèle de résistance est-il dominant ou récessif par rapport à l'allèle sauvage ? Ceci a un impact direct sur la stratégie de lutte contre la résistance. Par exemple, si l'allèle de résistance est récessif, on peut envisager l'utilisation de zones refuges non-traitées pour maintenir la sensibilité des populations.
- la résistance a été montrée pour un insecticide particulier, mais différentes matières actives du groupe des néonicotinoïdes existent. La mutation conférant la résistance de cible confère-t-elle une résistance équivalente à différentes matières actives du groupe des néonicotinoïdes ?

Un cycle biologique complexe

Le caractère polyphage du puceron vert du pêcher, associé à sa capacité de migration importante, pourrait aboutir à une diffusion rapide des résistances entre différentes plantes hôtes. Son mode de reproduction pourrait également jouer un rôle dans sa capacité évolutive face aux pressions de sélection. En effet, *M. persicae* au cours de son cycle peut recourir à la reproduction sexuée (recombinaison entre les gènes du père et de la mère) ou asexuée (l'individu hérite de l'intégralité des gènes de sa mère).

Si le premier mode de reproduction permet de brasser rapidement la diversité génétique, le second (appelé aussi parthénogénèse) permet à un même individu d'engendrer rapidement une colonie importante d'individus identiques (ou clones). Ces capacités de reproduction permettent à la fois de produire rapidement des individus avec des résistances multiples rapidement mais également de les multiplier facilement et en grand nombre lorsque ceux-ci ont un génotype intéressant.



Myzus persicae, individu adulte ailé accompagné de cinq larves au stade L1 (Source : Unité RPP, Lyon)

Le projet de recherche

C'est une mutation sur la sous-unité β du récepteur nicotinique qui confère la résistance cible aux néonicotinoïdes. Celle-ci entraîne la substitution d'un acide aminé, l'arginine⁶² (Arg ou R), par une thréonine⁶³ (Thr ou T) en position 81. Les pucerons verts du pêcher (*M. persicae*) étant diploïdes⁶⁴, cette étude visait à mesurer, par des essais *in vitro*, le niveau de résistance à deux molécules néonicotinoïdes (imidaclopride et la thiaclopride)

⁶¹ L'acétylcholine est un neurotransmetteur, c'est-à-dire une molécule qui transmet de l'information sous forme d'un message chimique. Cette molécule joue un rôle important dans le système nerveux central des insectes, et chez l'Homme aussi. La réception du message chimique se fait via une molécule qu'on appelle un récepteur.

⁶² Un des vingt acides aminés contenus par les protéines.

⁶³ Autre acide aminé.

⁶⁴ Du grec *diploos*, double et *eidos*, en forme de : les cellules contiennent deux versions pour chacun de ses gènes.

selon le génotype à ce locus afin de déterminer le niveau de dominance de l'allèle de résistance.

Méthodologie

Dans le cadre des plans de surveillance « résistances » de la DGAL, des échantillons de *M. persicae* ont été prélevés, durant les années 2011, 2012 et 2013, dans des parcelles de pêchers et de colza où une baisse de l'efficacité du traitement avec des néonicotinoïdes avait été observée. Des clones avec des profils de résistances différents ont ainsi pu être isolés et conservés au laboratoire en élevage.

Une collection de 23 clones *M. persicae* (porteurs ou non de la mutation « R81T ») a ensuite été testée. Les trois groupes de génotypes de résistance différents⁶⁵ ont été phénotypés pour leur résistance à deux matières actives appartenant au groupe des néonicotinoïdes : l'imidaclopride et le thiaclopride. Le test consiste à soumettre des individus d'un clone à des solutions de concentration croissante en pesticide. On a ainsi pu obtenir les DL50 (dose létale pour 50% des individus testés) pour chacun des clones. Les valeurs des DL50 pour les différents groupes de génotypes de résistances nous permettent ensuite d'évaluer le niveau de dominance de l'allèle de résistance sur l'allèle sauvage. On a également pu évaluer la corrélation entre les DL50 obtenues avec les deux néonicotinoïdes.

Résultats

Dans cette étude, tous les clones homozygotes résistants ont montré un niveau beaucoup plus haut de résistance que les autres clones, avec une perte de sensibilité radicale aux deux néonicotinoïdes. Les clones hétérozygotes ont montré un niveau plus haut de résistance que les homozygotes sensibles quoique les niveaux de résistance contre les deux néonicotinoïdes, dans ces deux groupes de génotypes, se chevauchent. Il y a donc une récessivité partielle de l'allèle de résistance « R81T » pour ces deux molécules néonicotinoïdes : le niveau de dominance de l'allèle de résistance (D_{LC}) a été évalué à 0,316 pour l'imidaclopride et de 0,351 pour le thiaclopride (pour rappel $D_{LC} = 0,5$ pour des allèles co-dominants).

La très forte corrélation entre les DL50 mesurées au sein d'un clone pour l'imidaclopride et le thiaclopride montre que la résistance pour ces deux matières actives est croisée : lorsqu'un clone est résistant à une des molécules, il le sera à l'autre. Ainsi, si un clone est identifié au champ comme résistant à l'imidaclopride, la solution ne pourra pas passer par l'utilisation d'un néonicotinoïde différent.

Il est intéressant de noter qu'une grande diversité de niveaux de sensibilité a été trouvée au sein des différentes catégories de clones. Elle interpelle aussi : pourquoi y a-t-il une telle variabilité des phénotypes ? D'autres mécanismes importants jouent probablement un rôle dans cette grande variabilité des niveaux de résistance observée. L'existence d'une résistance de type métabolique (liée aux cytochromes à P450) est très probable. Des niveaux variables de résistance métabolique chez les différents clones pourraient expliquer, au moins en partie, cette diversité observée.

Publications issues de ce projet

Mottet, Claire, Séverine Fontaine, Laëticia Caddoux, Christine Brazier, Frédérique Mahéo, Jean-Christophe Simon, Annie Micoud, and Lise Roy. "Assessment of the dominance level of the R81T target resistance to two neonicotinoid insecticides in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)." *Journal of economic entomology* 109, no. 5 (2016): 2182-2189.

Les partenaires :

Benoît BARRÈS, Claire MOTTET, Séverine FONTAINE, Laëticia CADDUOX, Christine BRAZIER et Annie MICOUD

Anses, Laboratoire de Lyon – Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires (RPP)

Jean-Christophe SIMON, Frédérique MAHÉO

Inra, IGEPP Rennes

Lise ROY

CEFE Montpellier

Contact : claire.mottet@anses.fr

⁶⁵ 6 génotypes RR (homozygote sensible), 12 génotypes RT (hétérozygote) et 5 génotypes TT (homozygote résistant).

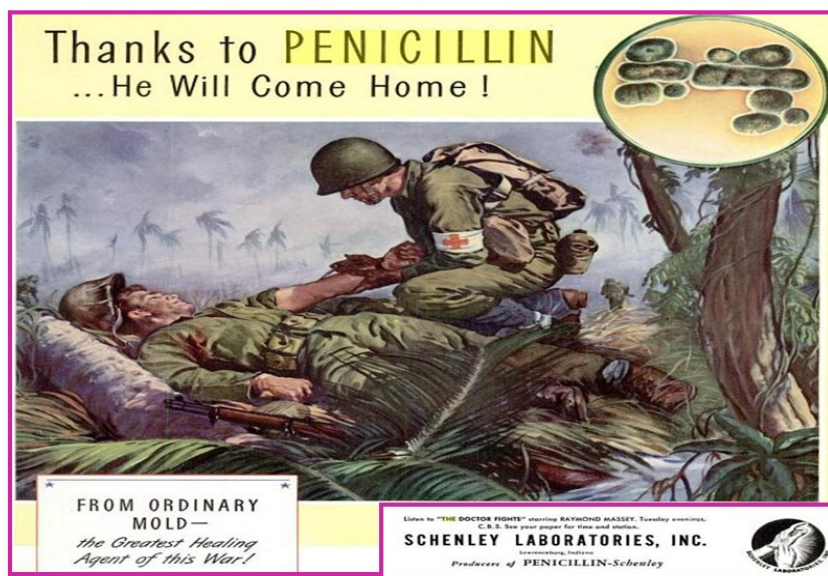


Antibiorésistance

Les antibiotiques (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») sont des médicaments utilisés de longue date en médecine humaine et vétérinaire, pour traiter les infections bactériennes liées à des microorganismes pathogènes. Le développement de résistances de bactéries aux antibiotiques a pris de l'ampleur depuis plusieurs décennies et constitue aujourd'hui un défi majeur de santé publique dans les pays de l'Union européenne et au niveau international.

Le développement des antibiotiques

Avec la découverte de la pénicilline, Sir Alexander Fleming ouvre une voie nouvelle, en 1928, dans le traitement d'infections bactériennes comme la pneumonie ou la méningite provoquées par le pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*), la syphilis provoquée par le tréponème pâle (*Treponema pallidum*), les infections cutanées suppuratives provoquées par le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*), etc. L'émergence de la médecine microbienne et l'utilisation de nouvelles thérapies conduit, à partir de la période de la seconde guerre mondiale (1939-1945), à la production industrielle à grande échelle des pénicillines et d'autres antibiotiques, comme les céphalosporines de première génération. La découverte des sulfamides constitue un chapitre tout aussi essentiel du développement des antimicrobiens dans le premier tiers du XX^{ème} siècle et qui valut au bactériologiste Gerhard Domagk (1895-1964) le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1939.



Affiches de la Seconde guerre mondiale faisant la promotion de la pénicilline

Dès les années 1950, les travaux de recherches sur les antibiotiques ont été encouragés, rendant possible le traitement de maladies transmissibles parfois considérées alors comme incurables telles que la dysenterie bactérienne, la fièvre typhoïde, la lèpre, la peste, la tuberculose, mettant en jeu la vie des personnes. C'est le cas des découvertes de molécules comme les macrolides (utilisées dans le traitement d'infections pulmonaires atypiques) ou les fluoroquinolones (utilisées dans le traitement d'infections des voies urinaires).

Le sentiment a ainsi longtemps prévalu dans les pays développés que le danger microbien faisait désormais partie du passé - le développement des antibiotiques ayant permis de sauver de nombreuses vies. On voyait dès cette période apparaître la promesse d'un monde dans lequel les infections bactériennes allaient être

maîtrisées. Les antibiotiques furent ainsi massivement utilisés en médecine humaine comme en médecine vétérinaire pendant plusieurs décennies. Certains antimicrobiens furent de plus utilisés comme facteurs de croissance dans des élevages agricoles.

L'utilisation massive et répétée d'antibiotiques a de fait entraîné une pression telle sur les bactéries qu'elles ont développé des systèmes de défense contre ces antibiotiques, conduisant à l'apparition de résistances. « *Ponctuelles au départ, ces résistances – comme l'affirme le Pr Laurent Gutmann⁶⁶ – sont devenues massives et préoccupantes* »⁶⁷. Certaines souches sont même multi-résistantes (entérobactéries, etc.), c'est-à-dire qu'elles résistent à plusieurs familles d'antibiotiques et peuvent conduire à des impasses thérapeutiques.



La résistance aux antibiotiques (antibiorésistance)

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), « *la résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement* »⁶⁸.

La résistance provient de la sélection naturelle, qui a doté les populations de bactéries (comme celles de tous les micro-organismes) de capacités de défense ou d'adaptation face à certains stress. Quand une bactérie est résistante, et se trouve dans un milieu chargé en antibiotiques, elle acquiert un avantage par rapport aux autres et se multiplie plus rapidement. Rapidement, ses descendants deviennent majoritaires. L'introduction de l'usage de nouveaux antibiotiques est suivie par l'apparition de nouvelles résistances bactériennes transmissible de surcroît à d'autres bactéries proches ou présentes dans le milieu par échanges de gènes. Le recours excessif et l'utilisation à mauvais escient des antibiotiques ont amplifié et accéléré le phénomène d'antibiorésistance, dans toutes les régions du monde.

Ce phénomène s'est généralisé dans les dernières décennies. L'ampleur du problème est telle qu'aujourd'hui un nombre croissant d'infections est devenu difficile, voire parfois impossible à traiter. Pour préserver notre capacité de prévenir et traiter les maladies infectieuses, l'Assemblée mondiale de la santé a lancé :

- en mai 2015, un Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens, qui inclut la résistance aux antibiotiques⁶⁹ ;
- en novembre 2015, une campagne mondiale pluriannuelle sur le thème « *Antibiotiques : à manipuler avec précaution* »⁷⁰.

La lutte contre le développement de l'antibiorésistance est devenue un enjeu majeur de santé publique : « *Il faut d'urgence changer dans le monde entier la façon dont nous prescrivons et utilisons ces médicaments* »⁷¹.

Parmi les pays européens, la France était sur la première marche du podium au début des années 2000 pour l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine. Elle comptait environ 100 millions de prescriptions par an, dont 80 % en ville. Un premier Plan d'action national a été mis en place pour répondre à l'enjeu de santé publique que pose l'antibiorésistance en 2001⁷², suivi par la mise en place d'une campagne très remarquée en 2002⁷³ pour préserver l'efficacité des antibiotiques. Si ces actions ont réussi à faire diminuer la consommation d'antibiotiques pour le traitement des maladies chez l'Homme de 11,4 % entre 2000 et 2015,

⁶⁶ Service de microbiologie de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, U 872 Inserm/UPMC/Université Paris Descartes.

⁶⁷ Dossier Inserm disponible sur l'internet : <https://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/resistance-aux-antibiotiques>

⁶⁸ OMS, *Résistance aux antibiotiques*, octobre 2016.

⁶⁹ Plan disponible sur l'internet : <http://www.who.int/drugresistance/documents/global-action-plan/fr/>

⁷⁰ En 2017, la *Semaine mondiale pour un bon usage des antibiotiques* se tiendra du 13 au 19 novembre.

⁷¹ OMS, *Résistance aux antibiotiques*, octobre 2016.

⁷² Premier Plan (2001-2005), deuxième Plan (2007-2010) et troisième *Plan national d'alerte sur les antibiotiques* (2011-2016).

⁷³ Slogan « *Les antibiotiques, c'est pas automatique* ».

la tendance semble être repartie à la hausse depuis 2010 : + 5,4%. La France reste toujours parmi les pays européens dont le niveau de consommation est élevé. En volume, 93 % de la consommation d'antibiotiques en médecine humaine provient du secteur de ville et 7% des établissements hospitaliers⁷⁴.



*La résistance aux antibiotiques, comment elle se propage
(Infographie, Source : Organisation mondiale de la Santé)*

Animaux + humains = une seule santé

Les animaux sont aussi des grands consommateurs d'antibiotiques. Si la législation européenne a interdit depuis 2006 l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance chez les animaux de rente, l'utilisation en médecine vétérinaire reste importante. Le plan Écoantibio 2017 vise la réduction de 25% de cet usage en cinq ans. Il convient de noter que le nombre estimé de traitements par animal et par an est en diminution notable depuis quelques années. Comme le soulignent Gérard Moulin et Jean-Pierre Orand (Direction ANMV, Anses), un effort particulier de réduction des antibiotiques est observé. « En 2015, le volume total vendu en France est le plus faible enregistré depuis le début du suivi : 514,3 tonnes (contre 913,6 tonnes en 2011 et 1.311 tonnes en 1999) »⁷⁵.

⁷⁴ ANSM, *L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2015*, Rapport, janvier 2017, p. 4

⁷⁵ Cf. Gérard Moulin et Jean-Pierre Orand, *Le suivi des antibiotiques en élevages*, pp. 59-61.

Toutefois, un point de préoccupation majeur porte sur les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^e et 4^e générations, qui sont responsables d'infections courantes chez le jeune animal : d'où les travaux menés par le laboratoire de l'Anses de Ploufragan/Plouzané présentés ici par Isabelle Kempf et Sandrine Baron⁷⁶.

La santé humaine et la santé animale sont indissociables en matière de lutte contre l'antibiorésistance. Le risque principal lié au développement de l'antibiorésistance est donc celui de la transmission de l'animal à l'homme et de l'homme à l'animal, de mécanismes de résistance à des bactéries, par contact direct, par voie alimentaire ou par l'environnement. Le projet présenté par Véronique Monnet⁷⁷ traite de la dissémination des gènes d'antibiorésistance par la chaîne alimentaire : quel est le rôle de la bactérie technologique *Streptococcus thermophilus* via la compétence naturelle ?

Le transfert des gènes d'antibiorésistance via les réservoirs environnementaux (notamment, l'eau) se retrouve également au cœur de quatre projets :

- le projet CIREC autour du traitement des eaux usées, source de dissémination de souches d'*Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques dans l'environnement (Alain Hartmann)⁷⁸ ;
- le projet ICarE participe à la recherche de solution alternative dans la lutte contre *Legionella pneumophila* (Julien Verdon)⁷⁹ ;
- le projet INQUASAN étudie la possibilité d'utiliser des invertébrés pour la surveillance des milieux aquatiques vis-à-vis des protozoaires (ex. *Cryptosporidium spp.*, *Toxoplasma gondii*) résistants au processus normal de désinfection de l'eau (Alain Geffard)⁸⁰ ;
- le projet dAbrAmOr autour de la dissémination d'agents pathogènes et de gènes d'antibiorésistance dans les sols et chez l'homme associés à l'épandage d'amendements organiques (Antoine Talarmin)⁸¹ ;



La résistance aux antimicrobiens (RAM)

Si la résistance des bactéries aux antibiotiques constitue une menace croissante pour la santé publique, d'autres microorganismes pathogènes deviennent également réfractaires à des traitements. Des mécanismes de résistance apparaissent et se propagent dans le monde compromettant la prévention et le traitement efficace d'un nombre croissant d'infections dues à des micro-organismes (ex. bactéries, champignons, virus, parasites). La résistance aux antimicrobiens (RAM) est un terme général qui désigne la résistance des différents types de micro-organismes et couvre la résistance aux médicaments antibactériens, antiviraux, antiparasitaires et antifongiques. Elle survient lorsque ces médicaments perdent leur efficacité et lorsque les infections persistent dans l'organisme. Le projet présenté ici par Carine Paraud s'intéresse à la problématique majeure posée par la gestion du parasitisme dans les troupeaux caprins laitiers : notamment, la résistance aux anthelminthiques des strongles gastro-intestinaux⁸².

⁷⁶ Cf. Isabelle Kempf et Sandrine Baron, *Les bactéries E. coli résistantes aux C3G chez les poussins*, pp. 42-43.

⁷⁷ Cf. Véronique Monnet, *La dissémination des gènes d'antibiorésistance par la chaîne alimentaire*, pp. 44-46.

⁷⁸ Cf. Alain Hartmann, *Les souches d'Escherichia coli résistantes aux antibiotiques*, pp. 40-41.

⁷⁹ Cf. Julien Verdon, *Pseudomonas Vs Legionella*, pp. 53-55.

⁸⁰ Cf. Alain Geffard, *Utilisation d'invertébrés aquatiques pour la surveillance des milieux aquatiques*, pp. 50-52.

⁸¹ Cf. Antoine Talarmin, *Dissémination d'antibiorésistance liée aux amendements organiques*, pp. 47-49.

⁸² Cf. Carine Paraud, *La résistance aux anthelminthiques des strongles gastro-intestinaux*, pp. 56-58.

La résistance à la colistine

La résistance à la colistine en médecine vétérinaire

Jean-Yves MADEC

Mots-clés : résistance traitement, gène résistance, polypeptide, colistine, entérobactérie, médecine vétérinaire

La colistine est un antibiotique de la famille des polypeptides utilisé régulièrement en médecine vétérinaire depuis les années 1950, notamment dans les filières animales de production. Elle est principalement utilisée chez des animaux jeunes, à la fois comme traitement curatif et préventif. En France, les indications majeures pour son usage sont les infections causées par les entérobactéries⁸³ chez les porcs⁸⁴ et les volailles⁸⁵. La colistine représente, pour ces filières, un des antibiotiques les plus utilisés ; elle est également utilisée chez les lapins, les ovins, les caprins et les ruminants producteurs de lait destiné à la consommation humaine. En France, pour l'année 2015, les données de ventes de médicaments vétérinaires montrent que le tonnage atteint pour la famille des polypeptides, toutes espèces confondues, est de 30,6 tonnes.

En médecine humaine, l'usage de la colistine a longtemps été écarté des protocoles de soins, en raison de sa toxicité rénale. Elle a été réintroduite comme traitement de dernier recours lors d'infections sévères notamment nosocomiales lorsque celles-ci étaient causées par des bactéries résistantes aux autres traitements⁸⁶. Jusqu'en 2015, l'absence de mécanisme de résistance à la colistine (transférable entre bactéries) constituait un argument scientifique fort pour son utilisation dans ce cas.

Mais, depuis le 18 novembre 2015, le premier mécanisme de résistance à la colistine transférable a

été décrit en Chine chez des bactéries infectant des porcs et des poulets, retrouvées dans de la viande vendue au détail, mais aussi chez des souches bactériennes isolées chez des patients hospitalisés. À la lumière de ces nouveaux éléments, la communauté scientifique et médicale s'est interrogée sur le risque de sélection de résistance à la colistine chez l'homme, suite à son usage chez l'animal :

- Faut-il classer la colistine sur la liste des antibiotiques d'importance critique (AIC) en médecine vétérinaire ? Faut-il réévaluer son profil de risque ?
- Si oui, quelles sont les alternatives à la colistine ? Quelle est la dynamique d'évolution ?...

La découverte des gènes de résistance

La colistine interagit sur des groupements phosphate des lipopolysaccharides (LPS) présentes sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif (dont les entérobactéries)⁸⁷. Ce premier mécanisme de résistance à la colistine transférable fait intervenir un gène nommé *mcr-1*⁸⁸ ; celui-ci code pour une enzyme⁸⁹ qui modifie la charge portée par une région des LPS qui deviennent moins sensibles à la colistine. Non seulement, il s'agit d'un nouveau mécanisme de résistance mais, surtout, le gène *mcr-1* est présent sur un plasmide (un fragment d'ADN en forme d'anneau) capable de se répliquer et d'être transféré entre souches bactériennes (ex. *Escherichia coli*,

Anses, Laboratoire de Lyon – Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes

⁸³ Bactéries intestinales, ex. *Escherichia coli* et *Salmonella spp.*

⁸⁴ Infections gastro-intestinales.

⁸⁵ Infections systémiques, respiratoires ou uro-génitales.

⁸⁶ Résistance des bactéries aux céphalosporines de dernière génération et aux carbapénèmes.

⁸⁷ Habituellement, la colistine interagit avec la partie anionique du lipide A du LPS de la membrane externe des bactéries à Gram négatif ; elle est transférée vers la membrane cytoplasmique perturbant par la suite la perméabilité membranaire bactérienne.

⁸⁸ De l'anglais, *Mobilized colistin resistance*.

⁸⁹ La phosphoéthanolamine transférase.

Klebsiella pneumoniae, *Pseudomonas aeruginosa*).

La publication de la séquence du gène *mcr-1* a conduit plusieurs instituts à rechercher sa présence dans les collections bactériennes à l'échelle mondiale⁹⁰. À ce jour, en Europe, il a été détecté dans des souches bactériennes d'*E. coli* et de *Salmonella enterica*, mais sa prévalence est particulièrement faible.

Toutefois, ce mécanisme n'est pas le seul à conférer une résistance à la colistine ; une équipe de chercheurs a identifié, en juin 2016, un nouveau gène de résistance à la colistine chez des isolats porcins et bovins d'*E. coli* résistants à la colistine mais ne contenant pas le gène *mcr-1*. Ce gène, nommé *mcr-2*, a été trouvé sur un plasmide similaire à *mcr-1* présentant une fréquence de transfert élevée entre espèces bactériennes. Plus récemment encore (juin et juillet 2017), les gènes *mcr-3* et *mcr-4* ont été identifiés. Il est donc conseillé de poursuivre la surveillance de la résistance à la colistine pour détecter toute augmentation de la résistance et suivre la dynamique d'évolution.

Les mesures de gestion

Compte-tenu de la découverte de ce nouveau gène de résistance et sa capacité potentielle à se propager rapidement, l'Agence Européenne du Médicament (EMA)⁹¹ a recommandé en juin 2016 :

- Un changement du classement de la colistine de la catégorie 1 (risque faible ou limité) à la catégorie 2 (antimicrobiens utilisés en médecine vétérinaire où le risque pour la santé publique est actuellement estimé supérieur) ;
- De ne pas interdire l'usage de la colistine en médecine vétérinaire, notamment chez les espèces productrices de denrées alimentaires, afin d'éviter d'accroître, entre autres, la pression sur les antibiotiques d'importance critique (ex. Fluoroquinolones, céphalosporines 3-4G) ;

- Une réduction de 65% de l'usage de la colistine en Europe.

De plus, pour assurer l'utilisation prudente de la colistine, la Commission européenne a publié le 14 juillet 2016 une décision demandant l'abrogation de toutes les autorisations de mise sur le marché (AMM) concernant les médicaments vétérinaires contenant de la colistine en association avec d'autres antibiotiques chez les animaux producteurs d'aliments dans l'ensemble de l'UE.

En France, l'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV) a supprimé 12 AMM pour les associations d'antibiotiques contenant de la colistine⁹² ainsi que les indications concernant l'usage préventif. Même si on note depuis quelques années une réduction de l'usage de la colistine dans les filières animales, l'impact de l'ensemble de ces mesures de gestion de risque (récemment adoptées) n'a pas encore pu être mesuré.

Quelles alternatives ?

Différents scénarii sont envisageables pour réduire la nécessité de recourir à la colistine : la vaccination contre certaines maladies (ex. pour prévenir des infections entériques à *E. coli* chez les porcelets ou les poulets de chair), l'utilisation d'acides organiques ou encore de métaux pour la prévention des infections digestives... Dans ce contexte, l'Anses a été saisie par le ministère chargé de l'Agriculture pour évaluer les bénéfices et les risques liés à l'utilisation de l'oxyde de zinc dans l'alimentation des porcelets au sevrage pour diminuer le recours aux antibiotiques dans la lutte contre les troubles digestifs apparaissant à cette période. Il ressort que ce type d'alternative présente des risques préoccupants pour l'environnement (ex. risque de contamination irréversible des sols) mais aussi de développement de résistance croisée zinc/antibiotiques (ex. chez le staphylocoque doré, il y a co-localisation du gène de résistance au zinc sur la cassette de résistance à la méticilline).

⁹⁰ Le gène *mcr-1* a été identifié dans trente pays sur les cinq continents chez des isolats vétérinaires et humains.

⁹¹ Suite aux conclusions du groupe d'experts sur l'antibiorésistance (AMEG).

⁹² À administration orale.

De plus, si l'usage de la colistine était interdit en médecine vétérinaire, il est probable que l'on s'orienterait vers un usage renforcé d'autres familles d'antibiotiques, importants également pour la santé humaine et pour lesquelles la résistance serait augmentée. Il importe donc de poursuivre la caractérisation du danger et l'évaluation de risque lié à l'usage de la colistine en médecine vétérinaire, de renforcer le contrôle de la surveillance⁹³ et de mettre en place un suivi étroit de la résistance pour détecter précocement tout signal d'alerte.



Utilisation
de l'oxyde de zinc
dans l'alimentation
des porcelets
au sevrage pour
diminuer le recours
aux antibiotiques

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Février 2013 Édition scientifique



Utilisation de l'oxyde de zinc dans l'alimentation des porcelets au sevrage pour diminuer le recours aux antibiotiques
(avis et rapport Anses, 2013)

Plusieurs projets de recherche :

Depuis de nombreuses années, l'Anses joue un rôle clé de surveillance et d'alerte concernant les phénomènes d'antibiorésistance dans le monde

animal, et en lien avec les conséquences possibles en santé publique. À ce titre, plusieurs projets de recherche concernant la résistance à la colistine en médecine vétérinaire sont en cours de réalisation au sein de l'Anses. Ils s'inscrivent dans le cadre du plan national ÉcoAntibio 1 ou d'appels à projets financés par l'Agence Nationale de la Recherche, nationaux ou trans-nationaux. Ils portent notamment sur :

- L'impact d'un traitement oral par la colistine sur la sélection de souches bactériennes inoculées chez le porc ;
- Le rôle de la voie d'administration et du mode d'élevage sur la résistance à la colistine chez le veau à la ferme ;
- La caractérisation phénotypique et moléculaire de la résistance à la colistine conférée par le gène *mcr-1* chez les souches d'*E. coli* issues de veaux ;
- L'étude de la transmission de la résistance plasmidique à la colistine ;
- Le développement de méthodes alternatives pour réduire la quantité de colistine utilisée dans des élevages de porcs⁹⁴ ;
- L'épidémiologie de la résistance à la colistine en élevage⁹⁵.

Publications issues de ces projets

Improvement in routine detection of colistin resistance in *E. coli* isolated in veterinary diagnostic laboratories. Jouy E, Haenni M, Le Devendec L, Le Roux A, Châtre P, Madec JY, Kempf I. *J Microbiol Methods*. 2017 Jan;132:125-127.

doi: [10.1016/j.mimet.2016.11.017](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.017) Epub 2016 Nov 26.

Lack of experimental evidence to support *mcr-1*-positive *Escherichia coli* strain selection during oral administration of colistin at recommended and higher dose given by gavage in weaned piglets. Viel A, Henri J, Perrin-Guyomard A, Laroche J, Couet W, Grégoire N, Laurentie M. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Jun 28. pii: S0924-8579(17)30212-1.

doi: [10.1016/j.ijantimicag.2017.04.013](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.013)

Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, Soumet C, Sanders P. *Euro Surveill*. 2016;21(6).

doi: [10.2807/1560-7917.ES.2016.21.6.30135](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.6.30135)

⁹³ Réseau Résapath, <https://www.resapath.anses.fr/>

⁹⁴ Projet Sincolistin. Financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), ref. ANR-15-CE21-0015 :

http://www.agence-nationale-recherche.fr/projet-anr/?tx_lwmsuivibilan_pi2%5BCODE%5D=ANR-15-CE21-0015


⁹⁵ Projet Prahad (ERA-Net ANIHWA). Financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), ref. ANR-14-ANWA-0006 :

<http://www.agence-nationale-recherche.fr/?Project=ANR-14-ANWA-0006>


Increasing Trends in mcr-1 Prevalence among Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates from French Calves despite Decreasing Exposure to Colistin. Haenni M, Métayer V, Gay E, Madec JY. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Sep 23;60(10):6433-4.

doi: [10.1128/AAC.01147-16](https://doi.org/10.1128/AAC.01147-16) 


Impact of food animal trade on the spread of mcr-1-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015. Grami R, Mansour W, Mehri W, Bouallègue O, Boujaâfar N, Madec JY, Haenni M. *Euro Surveill.* 2016;21(8):30144.

doi: [10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30144](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30144) 


Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. Haenni M, Poirel L, Kieffer N, Châtre P, Saras E, Métayer V, Dumoulin R, Nordmann P, Madec JY. *Lancet Infect Dis.* 2016 Mar;16(3):281-2.

doi: [10.1016/S1473-3099\(16\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00007-4)  Epub 2016 Jan 8.

Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Dec;48(6):598-606.

doi: [10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016)  Epub 2016 Oct 27. Review.

Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Webb HE1, Granier SA2, Marault M3, Millemann Y4, den Bakker HC1, Nightingale KK1, Bugarel M1, Ison SA1, Scott HM5, Loneragan GH1. *Lancet Infect Dis.* 2016 Feb;16(2):144-5.

doi: [10.1016/S1473-3099\(15\)00538-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00538-1)  Epub 2015 Dec 18.

Axe thématique antibiorésistance :

Jean-Yves MADEC

Directeur scientifique

Unités de recherche de l'Anses porteuses de projets

Jean-Yves MADEC

Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Anses, Lyon

Christophe SOUMET

Unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance, Anses, Fougères

Isabelle KEMPF

Unité Mycoplasmologie-Bactériologie, Anses, Ploufragan/Plouzané

Sophie GRANIER

Mission Antibiorésistance, Anses, Maisons-Alfort

Contact : jean-yves.madec@anses.fr



Les souches d'*Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques

Traitement des eaux usées : source de dissémination de souches d'*Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques dans l'environnement

Alain HARTMANN

Mots-clés : bactérie, antibiorésistance, entérobactérie, β -Lactamase à spectre étendu, *Escherichia coli*, traitement eau, dissémination, eau usée, médicament antibiotique, céphalosporine, dissémination, résistance, agriculture, contamination, sol, irrigation, boue station épuration, station épuration, Bourgogne, bassin de l'Ouche, Côte d'Or

Parmi les bactéries multi-résistantes (BMR), les entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre élargi (BLSE) occupent une place croissante. Les BLSE sont des enzymes qui confèrent à la bactérie un haut niveau de résistance à plusieurs antibiotiques de la famille des β -lactamines, comme les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) qu'elles hydrolysent. Dans les années 2000, les BLSE de la famille CTX-M⁹⁶ ont émergé de façon explosive chez les entérobactéries.

Escherichia coli

Parmi les entérobactéries, c'est *Escherichia coli* (entérobactérie commensale du tube digestif de l'homme et de l'animal) qui est l'espèce la plus concernée par cette production enzymatique. De nombreuses données épidémiologiques sur la prévalence et la diversité des souches humaines d'*E.coli* productrices de CTX-M sont disponibles :

- Leur portage digestif chez l'homme est en augmentation avec des chiffres parfois inquiétants dans certains pays (30 à 50% de la population) ;
- Leur description chez l'animal a également fait l'objet de nombreux travaux.

Cependant, il existe peu de données sur l'existence de réservoirs environnementaux pour ces souches, leur capacité à survivre dans l'environnement et en

particulier dans les eaux douces (rivières et eaux souterraines) et dans les sols.

Le projet de recherche : CIREC

Ce projet visait à étudier la prévalence et la caractérisation des souches d'*E.coli* productrices de BLSE de type CTX-M dans les eaux usées et les boues issues d'une quarantaine de stations d'épuration de la région Bourgogne. En particulier, il convenait de déterminer la prévalence de ces souches dans les eaux usées traitées et les boues afin d'optimiser leur valorisation en agriculture dans des conditions acceptables en termes de risque sanitaire.

Méthodologie

Au cours du travail, 41 sites de traitement d'eaux usées ont été analysés⁹⁷. Pour chaque site, des prélèvements d'eau brute et d'effluent traité ont été réalisés (à partir de prélèvements moyens sur 24h lorsqu'ils étaient disponibles). Des prélèvements de boue activée et de boue finale ont également été réalisés.

Une collection de plus de 1.000 souches d'*E.coli* a été constituée et un antibiogramme⁹⁸ (sur 16 antibiotiques) a été effectué pour chacune d'entre elles. De plus, le génotypage MLST⁹⁹ des souches d'*E.coli* productrices de BLSE a été réalisé et les souches ont été enregistrées dans les bases de données MLST *E. coli* (Enterobase¹⁰⁰).

INRA, UMR MSE, Dijon

⁹⁶ Pour céfotaximase-Munich. Enzyme décrite en 1990 par A. Bauernfeind.

⁹⁷ Dix de ces sites ont même été analysés deux fois à une année d'intervalle.

⁹⁸ Technique de laboratoire visant à déterminer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

⁹⁹ De l'anglais, *Multi locus sequence typing*.

¹⁰⁰ <https://enterobase.warwick.ac.uk/>

Résultats

Les analyses microbiologiques montrent que, pour 80% environ des sites de traitement des eaux usées (STEU), les eaux brutes et les eaux traitées sont contaminées par des souches d'*E.coli* productrices de BLSE de type CTX-M et ce, même pour des sites ne recevant pas d'effluents hospitaliers. Ces souches sont fréquemment multi-résistantes : en plus de leur résistance aux C3G, certaines souches sont également résistantes aux fluoroquinolones et/ou au cotrimoxazole.

“ En plus de leur résistance aux C3G, certaines souches *E.coli* sont également résistantes aux fluoroquinolones et/ou au cotrimoxazole. ”

Ces bactéries sont retrouvées essentiellement en zone karstique qui sont donc les environnements les plus vulnérables; il semble que des traitements tertiaires¹⁰¹ avant rejet des effluents de STEU devraient être utilisés et que des précautions devraient être prises lors des épandages de boues brutes sur les sols agricoles ou forestiers.

Afin de déterminer l'impact des rejets d'effluents des stations d'épuration sur la contamination d'un écosystème aquatique (en particulier au niveau de la faune) par des souches d'*E.coli* productrices de BLSE de type CTX-M, 127 poissons ont été analysés en amont et en aval de la STEU de Dijon-Longvic, différentes espèces ont été collectées et classées en fonction de leur régime alimentaire. Après analyse, 38 poissons sur 127 se sont révélés porteurs d'*E.coli* résistants aux C3G au niveau de leur intestin. Aucune différence n'est observée dans le portage de ces souches entre les poissons capturés en amont ou en aval de la STEU, ce qui peut s'expliquer par : i) une contamination uniforme des eaux de la rivière liée aux rejets en amont par d'autres STEU, ii) la mobilité des poissons dans la rivière. En plus de cette résistance aux C3G, les souches environnementales et animales (poissons) sont résistantes à d'autres antibiotiques, qui appartiennent à différentes

familles, dont les fluoroquinolones.

Enfin, il est à noter que les souches retrouvées dans l'environnement (ST131) présentent de fortes similarités avec les souches cliniques (d'origine humaine). De même, les souches du génotype ST10 (présentes dans les souches d'origine clinique) semblent persister particulièrement bien dans les stations d'épuration puisqu'elles sont retrouvées dans plus de 35% des STEU.

En Côte d'Or, les zones karstiques semblent plus à risque pour le transfert des souches résistantes. Il conviendrait de réaliser des actions préventives sur les eaux usées dans le but de réduire leur charge en *E.coli* résistantes avant rejet dans l'environnement.

Publications issues de ce projet

Chantemesse B, Betelli L, Solanas S, Vienney F, Bollache L, Hartmann A, et al. A nitrocefin-based amperometric assay for the rapid quantification of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewaters. *Water Res.* 2017;109:375-381.

Rochelet M, Solanas S, Betelli L, Chantemesse B, Vienney F, Hartmann A. Rapid amperometric detection of *Escherichia coli* in wastewater by measuring beta-D glucuronidase activity with disposable carbon sensors. *Anal Chim Acta.* 2015;892:160-166.

Les partenaires :

Alain HARTMANN

INRA, UMR MSE, Dijon

Catherine NEUWIRTH

Laboratoire de bactériologie, CHU de Dijon

Julie LIONS

BRGM, Direction Eau, Environnement et

Écotechnologies BioGéochimie

Environnementale et qualité de l'eau, Orléans

Monique FABRE

Laboratoire départemental de la Côte d'Or, Service Hydrologie, Dijon

Durée : 39 mois

Financement : 199.000 €

Contact : alain.hartmann@inra.fr

¹⁰¹ Épuration supplémentaire de l'eau avant rejet, après leur traitement en station d'épuration.



Les bactéries *E. coli* résistantes aux C3G chez les poussins

La résistance des souches d'Escherichia coli après l'administration de ceftiofur à des poussins Gallus gallus

Isabelle KEMPF et Sandrine BARON

Mots-clés : *Escherichia coli*, céphalosporines de troisième génération, poussin, médecine vétérinaire

Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des bactéries dites « Gram négatif » en forme de bâtonnet. Elles sont naturellement présentes à la fois dans la flore intestinale des volailles et dans leur environnement. La plupart d'entre elles sont inoffensives mais certaines souches sont pathogènes et peuvent provoquer des infections telles que des colibacilloses¹⁰².

Pour lutter contre les infections à *E. coli*, les antibiotiques étaient parfois utilisés à titre préventif au début de la vie des volailles. Il y a quelques années, les injections de céphalosporines de troisième génération (C3G) étaient parfois réalisées dans certains couvoirs, hors AMM. Dans le cadre des dispositifs de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les animaux en France (réseau RESAPATH, plans de surveillance européens), une augmentation de la résistance aux C3G a été constatée, jusqu'en 2010, chez les volailles (*Gallus gallus*), dans les filières ponte et chair. Face à cette augmentation de la proportion de bactéries *E. coli* résistantes aux C3G, une première enquête a été menée sur le terrain, entre juin 2011 et août 2012, afin d'évaluer l'impact de ces usages préventifs des antibiotiques sur la sélection et la persistance des *E. coli* résistantes au cours de la vie des volailles.

Une enquête sur le terrain

Un suivi longitudinal a été réalisé sur des lots de poussins¹⁰³ ayant été traités ou non par C3G

(ceftiofur) au couvoir. Pour chaque lot, des prélèvements de fientes ont été effectués à cinq reprises au cours de la vie des volailles afin de déterminer la sensibilité des *E. coli* de la flore digestive aux antibiotiques. Les résultats montrent que :

- Le traitement par C3G semble jouer un rôle sélectif. En effet, la proportion de souches *E. coli* résistantes à cet antibiotique est significativement plus élevée dans la microflore digestive des lots traités ;
- Les souches *E. coli* résistantes aux C3G ont été également trouvées dans les lots non traités, ce qui suggère une possible transmission verticale ou par le biais de l'environnement (couvoir, transport, bâtiment d'élevage...) ;
- Les plus forts taux d'*E. coli* résistantes aux C3G ont été détectés au plus jeune âge¹⁰⁴ (au 2^{ème} jour de la vie des volailles) ;
- Enfin, des souches résistantes étaient encore présentes lors des derniers prélèvements (ex. en fin de vie des poulets de chair).

En conditions expérimentales

Une seconde étude (mai-juillet 2012) menée en isolateurs avait pour but d'évaluer le transfert des *E. coli* résistantes aux C3G entre des poussins porteurs d'une souche résistante et des poussins sains, c'est-à-dire d'explorer les capacités colonisatrices d'une souche d'*E. coli* résistante sur des poussins indemnes

Anses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

¹⁰² Pathologie prédominante en élevages de poulets de chair (standards et certifiés) estimée à 89%.

¹⁰³ 12 lots de poussins traités en filière ponte (contre 10 lots non traités) et 15 lots de poussins traités en filière chair (contre 15 lots non traités).

¹⁰⁴ Ce pourcentage atteint au moins 80% à deux jours, puis décroît fortement.

d'organismes pathogènes. Trois isolateurs ont été utilisés :

- Le premier isolateur contenait 20 poussins traités par C3G (ceftiofur) : 10 d'entre eux ont été inoculés avec une souche résistante aux C3G et les 10 autres ont été gardés comme « contacts » non inoculés.
- Le deuxième isolateur contenait 20 poussins non traités : 10 d'entre eux ont été inoculés de la même manière avec une souche résistante aux C3G et les 10 autres ont été gardés comme « contacts » non inoculés.
- Le troisième contenait 10 poussins non traités et non inoculés.

Puis, des échantillons fécaux ont été collectés régulièrement pendant un mois et analysés. Les résultats expérimentaux montrent que les *E. coli* résistantes aux C3G colonisent autant les poussins traités (avec ceftiofur) et inoculés que les non traités. Ainsi, tous les poussins « contacts » deviennent porteurs de souches résistantes aux C3G. Enfin, ces souches résistantes persistent à des niveaux importants jusqu'à la fin de l'expérience ; ce qui suggère que ces souches ont des capacités colonisatrices remarquables.

“ Ces études ont permis de convaincre de la nécessité d'abandonner l'utilisation des C3G dans les couvoirs. ”

Il est à noter que les analyses réalisées en 2013 ont permis d'évaluer la sensibilité des souches résistantes aux C3G vis-à-vis des autres familles d'antibiotiques et de rechercher la présence des principaux gènes de résistance aux C3G. La majorité des souches étaient résistantes aux tétracyclines et des différences significatives entre lots traités et non traités étaient observées pour la résistance à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, à la streptomycine ou à la gentamicine. C'est pourquoi le respect de la biosécurité (ex. les étapes de nettoyage

et désinfection des bâtiments...) est encore plus nécessaire avec ces souches colonisatrices.

Ces études ont permis de convaincre de la nécessité d'abandonner l'utilisation des C3G dans les couvoirs. Ces molécules sont maintenant des antibiotiques critiques dont l'utilisation est réglementée (interdiction en usage préventif, prescription sous conditions¹⁰⁵).

Publications issues de ce projet

Impact of Third-Generation-Cephalosporin Administration in Hatcheries on Fecal Escherichia coli Antimicrobial Resistance in Broilers and Layers. 2013. AAC 58(9): 5428-34. Baron, S., Jouy, E., Larvor, E., Eono, F., Bougeard, S. and Kempf, I.

Impact of the administration of a third-generation cephalosporin (3GC) to one-day-old chicks on the persistence of 3GC-resistant Escherichia coli in intestinal flora: An in vivo experiment. 2016. Vet. Mic. 185 : 29-33. Baron, S., Jouy, Eric., Touzain, F., Bougeard, S., Larvor, E., de Boisseson, C., Amelot, M., Keita, A. and Kempf, I.

Anses - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané : les équipes

Isabelle KEMPF, Sandrine BARON, Eric JOUY et Emeline LARVOR

Unité Mycoplasmiologie-Bactériologie (MB)

Alassane KEITA et Michel AMELOT

Service d'élevage et d'expérimentation avicole et cunicole (SELEAC)

Nicolas ROSE, Stéphanie BOUGEARD et Florent EONO

Unité Epidémiologie et Bien-être du porc (EBEP)

Yannick BLANCHARD, Fabrice TOUZAIN et Claire de BOISSÉSON

Unité Génétique virale et biosécurité (GVB)

Durée : 24 mois

Financement : Anses

Contact : isabelle.kempf@anses.fr

¹⁰⁵ Décret 2016-317.

La dissémination des gènes d'antibiorésistance par la chaîne alimentaire

Dissémination des gènes d'antibiorésistance par la chaîne alimentaire : quel rôle de la bactérie technologique Streptococcus thermophilus via la compétence naturelle ?

Véronique MONNET

Mots-clés : gène, antibiorésistance, chaîne alimentaire, lait, produit laitier, bactérie lactique, *Streptococcus thermophilus*, dissémination, peptide, régulateur

La plupart des bactéries pathogènes sont communes aux humains et aux animaux. Ainsi, 60% des pathogènes humains proviennent des animaux. C'est de cette observation qu'est né le concept « *One health/Une seule santé* », maintenant bien partagé au niveau mondial. Dans ce cadre, aborder la question de la diffusion de la résistance aux antibiotiques en se focalisant sur la chaîne alimentaire des produits d'origine animale est particulièrement pertinent.



Concept « *One health/Une seule santé* »
(Source : Commissions européennes)

Les bactéries résistantes aux antibiotiques sont maintenant présentes à tous les niveaux chez les animaux et dans leur environnement, et dans les produits animaux. Il serait illusoire d'espérer les éliminer rapidement chez l'animal. Par contre, chercher à interrompre la chaîne de transmission de l'animal à l'homme paraît une stratégie efficace pour au moins limiter le transfert de ces résistances à l'homme.

Le transfert des gènes d'antibiorésistance

Traditionnellement, la recherche sur le transfert des gènes d'antibiorésistance s'est focalisée sur les bactéries pathogènes, que l'on cherchait par tous les moyens à éliminer. Cependant, les bactéries commensales¹⁰⁶ jouent un rôle clé dans l'évolution et la dissémination de l'antibiorésistance, à cause, en particulier, de leur abondance et de leur diversité. C'est pourquoi, la commission du *Codex Alimentarius*¹⁰⁷ a indiqué, récemment, que l'évaluation du risque ne devait plus seulement concerner les bactéries pathogènes alimentaires mais aussi l'ensemble des bactéries de l'aliment.

Dans les environnements microbiens, le transfert horizontal de gènes, en particulier ceux rendant résistant aux antibiotiques, s'opère selon différents mécanismes :

- **La conjugaison** qui permet le transfert d'un brin d'ADN entre deux bactéries en contact et vivantes. C'est le phénomène qui prévaut dans cette dissémination chez les bactéries lactiques en général et chez les entérocoques en particulier.
- **La transformation** qui est l'incorporation d'ADN libre de l'environnement dans le génome d'une bactérie, dite compétente lorsqu'elle est en état d'incorporer l'ADN.

Inra, UMR MICALIS Inra, Jouy-en-Josas

¹⁰⁶ L'expression est employée ici au sens large ; elle inclut les bactéries commensales (qui vivent dans un organisme sans lui porter préjudice) mais aussi les bactéries technologiques utilisées comme levains ou les bactéries probiotiques utilisées comme additifs pour la santé.

¹⁰⁷ Normes internationales alimentaires : <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/fr/>

Dans le lait et l'environnement laitier

La question du transfert des gènes d'antibiorésistance entre espèces proches est particulièrement pertinente dans la chaîne alimentaire laitière. Les streptocoques, qui regroupent un vaste ensemble de bactéries, sont en effet présents dans le lait et l'environnement laitier à l'image de *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. macedonicus* souvent associés aux mammites (inflammations de la mamelle). Or, l'utilisation d'antibiotiques pour traiter les mammites, pendant la lactation, est fréquente (jusqu'à 55% des vaches traitées) et les infections de la mamelle représentent 69% des infections traitées chez la vache. Si cette pratique favorise l'acquisition des gènes d'antibiorésistance, la question qui se pose est celle du devenir de ces gènes lors de la fermentation du lait.

“ L'utilisation d'antibiotiques pour traiter les mammites, pendant la lactation, favorise l'acquisition des gènes d'antibiorésistance. ”

Le projet de recherche : MARS

La charge bactérienne des laits crus pouvant atteindre 10^5 bactéries/mL, il est très probable que de l'ADN bactérien libre persiste, même après traitement thermique du lait et dissolution (lyse) des bactéries ou qu'il puisse être réintroduit à partir de l'environnement industriel pendant le procédé de fabrication. La persistance de l'ADN dans le lait étant peu documentée, cette étude de faisabilité visait à évaluer le rôle, possible mais encore inconnu, des bactéries lactiques utilisées comme levains : plus particulièrement, *Streptococcus thermophilus* (bactérie non pathogène massivement utilisée dans la fermentation des laits crus) en tant que réservoir et vecteur de gènes d'antibiorésistance dans la chaîne alimentaire et dans la transmission de ces

gènes de pathogènes animaux vers les microbiotes humains.

En écho à une étude récente qui démontrait que des fragments provenant d'OGMs¹⁰⁸ n'étaient pas dégradés par la pasteurisation du lait, ce projet visait à :

- savoir si *S. thermophilus* pouvait acquérir, par transformation naturelle, des gènes d'antibiorésistance lors de la fermentation du lait ;
- évaluer, dans l'affirmative, les paramètres susceptibles d'intervenir dans cette transformation (ex. traitement et composition des laits, contenu et concentration en ADN bactérien libre, capacité des souches de *S. thermophilus* à être naturellement compétentes dans le lait).

Méthodologie

Pour étudier la compétence naturelle des souches de *S. thermophilus*, 11 souches de diverses origines ont été utilisées. Un test a été mis au point qui consistait à faire entrer, par exemple, des ADN chromosomiques de streptocoques porteurs de gènes d'antibiorésistance et à suivre l'apparition de transformants « antibiotique-résistants » toutes les 30 minutes pendant 2h. Enfin, la transformation de *S. thermophilus* avec de l'ADN de 17 souches de streptocoques pathogènes¹⁰⁹ a été testée.

Il est à noter que, pour rechercher la présence de gènes d'antibiorésistance de streptocoques pathogènes dans le lait, différents laits ont été utilisés : lait cru de ferme, pasteurisé, microfiltré, UHT de commerce, lait en poudre, etc.

Résultats

Bien que le lait contienne des gènes d'antibiorésistance, le risque de transfert à *S. thermophilus* par transformation naturelle est très faible. Les éléments qui permettent de le dire, sont :

- la faible quantité de l'ADN bactérien dans le lait et l'incertitude quant à sa nature libre ;

¹⁰⁸ Détectés par réaction en chaîne par polymérase (PCR).

¹⁰⁹ Espèces de *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, porteuses de gènes d'antibiorésistance.

- l'absence de recombinaison chez *S. thermophilus* d'ADN de streptocoques pathogènes porteurs de gènes d'antibiorésistance.

Ces données sur l'ADN bactérien des laits sont tout à fait nouvelles.

Néanmoins, des souches de bactéries lactiques technologiques résistantes (incluant *S. thermophilus*) ont été décrites, dans la littérature, dans des produits laitiers commercialisés alors que les fournisseurs de levains produisent des souches dépourvues de gènes d'antibiorésistance. Ceci suggère un transfert horizontal de gènes pendant le processus de fermentation. Quelques-uns ont été isolés, au cours de ce projet, dans des laits crus de ferme.

Le séquençage de ces souches permettrait de mieux comprendre par quel mécanisme, les gènes d'antibiorésistance ont intégré leur génome et quels sont les risques associés. L'analyse du génome de *S. thermophilus* indique, en effet, que cette bactérie a acquis de l'ADN exogène provenant d'autres bactéries lactiques telles que *Lactobacillus bulgaricus* (son partenaire dans le yaourt) ou *Enterococcus faecalis*. De plus, des gènes associés à la résistance au triméthopime, à la tétracycline ou à l'érythromycine et provenant de bactéries potentiellement présentes dans les aliments, sont présents dans certaines souches de *S. thermophilus* isolées de produits laitiers. Ce phénomène reste très variable en conditions de laboratoire, preuve que tous les paramètres environnementaux ne sont pas maîtrisés et doivent être identifiés.

Les partenaires :

Véronique MONNET

Inra, UMR MICALIS Inra, Jouy-en-Josas

Jean-Yves MADEC

Anses, Lyon, Antibiorésistance et Virulences bactériennes, Lyon

Patrice MARTIN

Inra, UMR 1313 Génétique animale et Biologie intégrative, Équipe LGS-ICE, Jouy-en-Josas

Durée : 26 mois

Financement : 49.993 €

Contact : veronique.monnet@inra.fr

Dissémination d'antibiorésistance liée aux amendements organiques

Dissémination d'agents pathogènes et de gènes d'antibiorésistance dans les sols et chez l'homme associés à l'épandage d'amendements organiques

Antoine TALARMIN

Mots-clés : antibiorésistance, gène résistance, dissémination, épandage, sol, amendement organique, engrais organique, déchet animal, boue station épuration, compostage, antibiotique, tétracycline, sulfonamide, bêtalactamine, macrolide, polypeptide, Guadeloupe, climat tropical, culture maraîchère, concombre, patate douce

L'antibiorésistance concerne non seulement la médecine humaine mais aussi la médecine vétérinaire, pour laquelle différentes mesures ont été prises par l'Union européenne comme l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance chez les animaux de ferme, ou encore la mise en place de systèmes de surveillance de la nourriture animale¹¹⁰.

Les ventes d'antibiotiques vétérinaires

Le suivi des ventes de médicaments vétérinaires rapporte que le volume total des ventes d'antibiotiques était de 1014 tonnes en 2010¹¹¹. Ce tonnage est globalement le double de ce qui a été consommé en santé humaine durant la même période ; il représente donc un risque élevé de dissémination des antibiotiques dans l'environnement et, par conséquent, d'émergence et de dispersion des résistances. Parmi les diverses classes d'antibiotiques, les tétracyclines sont toujours les plus fréquemment utilisées, suivies par les sulfonamides, les bêtalactamines, les macrolides, les aminosides et les polypeptides. Or, beaucoup de ces antibiotiques sont peu adsorbés dans les intestins. Ainsi, environ 20 à 90% de ces médicaments administrés sont rapidement excrétés. Ceci a pour effet non seulement de favoriser l'émergence de résistances au sein de la microflore animale mais aussi de permettre la sélection et la

dissémination de nouvelles bactéries résistantes, ainsi que le passage des antibiotiques dans les déchets organiques animaux. Ces derniers étant communément recyclés sous forme d'engrais, ils constituent donc une source de risque élevée dans la dispersion des antibiotiques et de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques (GRAs) dans l'environnement.

En Guadeloupe

En Guadeloupe, l'épandage de déchets organiques sur les terres agricoles est une pratique communément répandue, qui permet d'augmenter, comme partout dans le monde, le contenu du sol en matière organique. Des données préliminaires indiquent que les antibiotiques vétérinaires utilisés sont très variés et que les cultures maraîchères sont les plus concernées par l'épandage d'amendements organiques (ex. lisier de porc, compost issu de fumier de cheval ou de fientes de volailles, boues de stations d'épuration). Mais, très peu de données concernant les résistances aux antibiotiques sont disponibles pour cette île à climat tropical. Or, ce type de climat chaud et humide favorise la croissance des bactéries d'intérêt, majoritairement mésophiles¹¹² et à besoin élevé en eau. Par conséquent, le risque de rencontre des bactéries est plus élevé, augmentant ainsi la probabilité des transferts de gènes potentiellement porteurs de GRAs.

¹¹⁰ Loi du 1er janvier 2006.

¹¹¹ Cf. article de l'ANMV sur le suivi des ventes...

¹¹² Bactéries qui vivent à des températures comprises entre 20° et 40° C.

Si les données sur les résistances aux antibiotiques sont encore très parcellaires, des médecins hospitaliers rapportent, par exemple, un grand nombre d'infections liées à des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu (BLSE). D'autre part, une autre étude entreprise par l'Institut Pasteur de Guadeloupe a trouvé, dans les eaux de rejet des stations d'épuration, de nombreuses entérobactéries (ex. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) porteuses de BLSE et de céphalosporinases¹¹³ de haut niveau.

Le projet de recherche : dAbrAmOr

Le projet dAbrAmOr s'intéresse principalement à la dissémination environnementale de la résistance aux antibiotiques liée à l'utilisation d'amendements organiques dans les cultures guadeloupéennes. Les résultats permettront ainsi d'obtenir les premières données sur les vecteurs de dissémination des résistances aux antibiotiques présents dans les différents amendements organiques (issus d'élevages et des boues de STEP) et dans les sols guadeloupéens : prémices indispensables à la mise en place d'un réseau de surveillance nécessaire dans ce département afin d'intégrer le RESAPATH¹¹⁴.

“ *Le projet permettra d'obtenir les premières données sur les vecteurs de dissémination des résistances aux antibiotiques, présents dans les différents amendements organiques et dans les sols guadeloupéens.* ”

Le contexte guadeloupéen est une originalité du projet proposé. En effet, il n'existe dans les Antilles françaises aucun état des lieux ni étude relatant :

- La dissémination de bactéries résistantes aux antibiotiques ainsi que des GRAs dans l'environnement ;

- L'effet de la dissémination de ces bactéries résistantes sur les flores bactériennes telluriques ;
- Les risques associés à l'utilisation de boues de STEP et d'engrais organiques dans l'épandage des cultures associées à l'alimentation humaine / maraichères.



Parcelle expérimentale Pitaya – Petit Bourg

Méthodologie

Ce projet implique l'utilisation de méthodes de compostage, de cultures de légumes et légumes-racines, de chimie, de bactériologie, de biologie moléculaire et de bio-informatique. La zone d'étude a été définie sur un périmètre géographique concentré (200 m²) afin de limiter les variations liées aux caractéristiques physico-chimiques des sols. La partie de l'exploitation agricole dédiée au projet, précédemment utilisée pour cultiver l'igname, est en friche depuis cinq ans et exempte de chlordécone¹¹⁵. Ont été retenues pour l'étude, les cultures de concombres (*Cucumis sativus*) et de patates douces (*Ipomoea batatas*), en raison notamment de la consommation abondante de ces produits en Guadeloupe.

Les prélèvements de sols, d'engrais organiques et d'aérosols sont dilués en eau physiologique et différentes dilutions sont ensemencées sur des milieux spécifiques de bacilles gram-négatif ou d'entérocoques, additionnés ou non d'antibiotiques

¹¹³ Enzymes augmentant le niveau de résistance naturelle des bactéries aux antibiotiques.

¹¹⁴ ... Cf. article sur le RESAPATH...

¹¹⁵ Inférieur au seuil de détectabilité.

afin de dénombrer les bactéries totales et résistantes, puis de déterminer un pourcentage de bactéries résistantes aux antibiotiques. De plus, l'ADN est extrait de ces différents prélèvements et des approches métagénomiques sont utilisées pour étudier les gènes de résistance et les taxons bactériens présents.

Premiers Résultats

Les études de microbiologie classique ont permis de montrer que les bactéries résistantes aux quinolones et aux bêta-lactamines sont retrouvées dans les intrants « fientes » et « déchets verts », mais ne sont pas détectables dans les composts. Ceci suggère que le compostage abaisse la charge en bactéries résistantes. Les études de métagénomique confirment une baisse de la densité bactérienne mais aussi des gènes de résistance aux antibiotiques lors du compostage. Ces deux approches complémentaires montrent l'intérêt du compostage avant épandage afin d'en réduire la charge en microorganismes (pathogènes et non pathogènes porteurs de GRAs).

Grâce à cette réduction du nombre de bactéries, les risques pour la santé humaine, que ce soit celle des agriculteurs ou celle des consommateurs, sont également réduits.

Les partenaires :

Antoine TALARMIN

Institut Pasteur de la Guadeloupe Morne Jolivière,
97183 Abymes

Sylvie NAZARET

Université Lyon 1, UMR CNRS 5557 Écologie
Microbienne, 69622 Villeurbanne

Didier BOISMOREAU

Association PITAYA, 97170 Petit Bourg

Durée : 30 mois

Financement ADEME : 196.262 €

Contact : atarmin@pasteur-guadeloupe.fr

Utilisation d'invertébrés aquatiques pour la surveillance des milieux aquatiques

Utilisation d'invertébrés aquatiques pour évaluer la qualité sanitaire des masses d'eau

Alain GEFFARD

Mots-clés : qualité eau, traitement eau, station épuration, contamination biologique, protozoaires, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, oocystes, animal invertébré, milieu aquatique, eau douce

L'eau peut abriter de nombreux pathogènes pour l'Homme, incluant les virus, les bactéries, mais également les parasites. C'est le cas notamment pour des protozoaires tels que *Cryptosporidium spp.* et *Toxoplasma gondii*, clairement identifiés comme des priorités de santé publique. De plus, leurs oocystes sont résistants aux processus normal de désinfection de l'eau, et ils ont été détectés en grand nombre dans les effluents terminaux des stations d'épuration (STEP). Ceci accroît le risque de les retrouver dans les eaux de surface potentiellement utilisées par l'homme à des fins agricoles et récréatives. La surveillance des masses d'eau vis-à-vis de ces protozoaires apparaît donc primordiale.

La surveillance des milieux aquatiques

Actuellement, l'évaluation de la qualité biologique des eaux douces repose sur des indicateurs bactériologiques tels que *Escherichia coli* et autres coliformes fécaux et totaux. Or, ces indicateurs ne reflètent pas ou peu la qualité sanitaire globale. En effet, il a été mis en évidence que certains sites, négatifs pour les indicateurs de bactéries fécales, étaient au contraire positifs pour les protozoaires ; et, inversement.

D'autre part, la détection de protozoaires est difficile. D'une part, elle nécessite la filtration de grands volumes d'eau. D'autre part, on ne sait pas obtenir des résultats suffisamment fiables et robustes dans un contexte de surveillance. La technique d'immunofluorescence utilisée, par exemple, pour la détection de *Cryptosporidium*, n'est pas développée

pour *Toxoplasma gondii*. Ainsi, a-t-il été proposé de quantifier les protozoaires non pas selon cette technique mais à partir de la présence de leur ADN, par PCR¹¹⁶ en temps réel.

Il n'en reste pas moins que, pour suivre le niveau de contamination des milieux aquatiques par les protozoaires, il serait intéressant de mettre en place un outil intégrateur et rapide, de façon similaire à ce qui a été développé pour la contamination chimique.



Gammare (Source : Irstea, Lyon)

Les invertébrés d'eau douce

Des expériences en laboratoire ont démontré la capacité des invertébrés aquatiques à concentrer une grande quantité d'oocystes présents dans l'eau contaminée, tout en maintenant leurs capacités infectieuses. De par leur capacité de filtration (pour mollusques bivalves) et/ou leur rôle dans le transfert

¹¹⁶ Amplification en chaîne d'un brin d'ADN ayant des caractéristiques précises (liée à l'espèce qu'on recherche), par réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais, "polymerase chain reaction").

au sein des réseaux trophiques (pour les crustacés gammaridés), les invertébrés peuvent donc représenter une voie importante de dissémination des oocystes dans les milieux aquatiques.

Cette capacité de bioaccumulation existe pour les contaminants chimiques et, de ce fait, un intérêt tout particulier a été porté aux invertébrés d'eau douce pour évaluer la contamination de l'environnement. Les invertébrés, comme les mollusques bivalves et les crustacés, sont aujourd'hui reconnus pour intégrer la contamination des milieux (capacités de bioaccumulation) et donc faciliter le diagnostic. La question qui se pose est la possibilité d'utiliser également ces invertébrés comme « outil » intégrateur dans la cadre de la surveillance biologique des milieux aquatiques.

Le projet de recherche : INQUASAN

Cette étude de faisabilité est une étape préliminaire indispensable au développement de cette nouvelle démarche. Elle se focalise sur deux espèces :

- **la moule zébrée** (*Dreissena polymorpha*) qui est un organisme sédentaire, possédant une importante capacité de filtration ;
- **le gammare** (*Gammarus fossarum*) qui est une espèce de crustacé très commune en Europe, jouant un rôle important dans la chaîne trophique comme déchetiqueur et étant la proie de nombreux vertébrés.

Ces deux espèces ont des comportements alimentaires différents et sont potentiellement exposées selon différentes voies (ex. particules des milieux, conditions physico-chimiques) aux différentes formes possibles des protozoaires. Leur utilisation expérimentale permettrait donc de couvrir une grande diversité d'hydrosystèmes.

Méthodologie

Lors de précédents travaux, la capacité de la moule zébrée (ou dreissène) à accumuler les protozoaires *C. parvum* et *T. gondii* a été démontrée en conditions

contrôlées, au laboratoire. Par contre, aucune information n'était disponible au sujet du gammare. La première tâche du projet a consisté à caractériser la bioaccumulation des protozoaires par cet invertébré dans des conditions similaires.



Dreissène (Auteur : F. Palais)

Le second volet du projet concernait l'étude de la capacité de ces deux modèles biologiques à accumuler les protozoaires en conditions réelles, après transplantation, en amont et en aval de cinq STEP sur l'Oise, l'Aisne, la Marne, la Vesle et la Meuse ainsi qu'au niveau d'usines de potabilisation d'eau. À chacune des dates de prélèvements, les échantillons (dreissènes et gammares) ont été analysés pour la détection et la quantification des deux protozoaires.

Résultats

- **En laboratoire** : les résultats démontrent, pour la première fois, la capacité du gammare à accumuler *T. gondii*. Cependant, les niveaux d'imprégnation sont faibles par rapport à la charge de protozoaires présente dans le milieu d'exposition¹¹⁷. Ceci peut s'expliquer par i) une faible capacité d'accumulation des gammares, ii) leur capacité à dégrader et à éliminer les protozoaires, iii) mais aussi par de possibles interférences de la matrice biote sur l'extraction et la quantification des protozoaires par PCR¹¹⁸ nécessitant l'amélioration des protocoles.

¹¹⁷ Les gammares étaient exposés à une charge de 200, 2000 ou 20 000 parasites (*T. gondii* et *C. parvum*) par individu et par jour sur une période de 21 jours avec des prélèvements à 7, 14 et 21 jours.

¹¹⁸ Il peut y avoir présence d'inhibiteurs, c'est-à-dire des molécules bloquant l'action de la polymérase qui provoque l'amplification de l'ADN recherché.

- **In situ** : pour la dreissène, les résultats indiquent une détection de *T. gondii* dans quelques échantillons transplantés à l'aval d'une STEP, mais à un niveau ne permettant pas une quantification précise. À l'inverse, *C. parvum* n'a jamais été détecté dans les organismes. Or, sur la même période, les suivis de masses d'eau utilisés par le Syndicat des Eaux de l'Île de France (SEDIF) montre la présence régulière de *C. parvum* (*T. gondii* n'étant pas suivi).

Si l'intérêt pour ces deux modèles biologiques semble confirmé, en laboratoire, pour évaluer la qualité sanitaire de l'eau, la validation de cette démarche potentielle requiert cependant de poursuivre les investigations afin d'améliorer les connaissances sur les interactions invertébrés/protozoaires mais aussi de lever les derniers verrous techniques.

Publications issues de ce projet

Bigot-Clivot A, Palos-Ladeiro M, Lepoutre A, Bastien F, Bonnard I, Dubey JP, Villena I, Aubert D, Geffard O, François A, Geffard A (2016). Bioaccumulation of Toxoplasma and Cryptosporidium by the freshwater crustacean Gammarus fossarum: involvement in biomonitoring surveys and trophic transfer. Ecotoxicology and Environmental Safety 113, 188-194.

Kerambrun E., Palos Ladeiro M., Bigot-Clivot A., Dedourge-Geffard O., Dupuis E., Villena I., Aubert D., Geffard A. (2016). Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne Toxoplasma gondii. Journal of Applied Microbiology 120, 498-508 (contribution associée à un autre projet, PIREN Seine).

Les partenaires :

Alain GEFFARD

Université Reims Champagne Ardenne, UMR-I 02 SEBIO, Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, Reims

Isabelle VILLENA

CHU et Université Reims Champagne Ardenne, EA 3800 PROTAL, Laboratoire Protozooses transmises par l'alimentation, Reims

Olivier GEFFARD

Irstea, Laboratoire d'écotoxicologie, UR BELY, TR Belca, Villeurbanne

Durée : 26 mois

Financement : 49.015 €

Contact : alain.geffard@univ-reims.fr



Pseudomonas Vs Legionella

Identification et caractérisation de molécules produites par des souches de Pseudomonas environnementales pour la lutte biologique contre Legionella pneumophila

Julien VERDON

Mots-clés : traitement eau, contamination biologique, *Legionella*, *Legionella pneumophila*, légionelle, protozoaire, traitement, biocide, méthode alternative, amibe, bactérie, *Pseudomonas*, biofilm, mécanisme d'action, lipopeptides, surfactant

Les circuits et réseaux d'eau subissent, épisodiquement, des problèmes de contamination (par des micro-organismes et/ou de la matière organique) pouvant entraîner une dégradation de la qualité microbiologique des eaux circulantes. Ils peuvent ainsi constituer des sites de prolifération et de dissémination pour toute une variété de germes pathogènes opportunistes comme *Legionella pneumophila*, agent responsable de la légionellose.

Legionella pneumophila

L. pneumophila fait partie de la communauté microbienne naturelle des écosystèmes aquatiques ; c'est un bacille à Gram négatif qui, à partir des sols humides et des eaux douces (ex. lacs, rivières), peut coloniser des sites hydriques artificiels comme les réseaux d'eau chaude sanitaire (ex. robinetteries, douches), les conditionneurs d'air ou encore les tours aéroréfrigérantes (TAR). Généralement, la présence de *L. pneumophila* dans l'environnement est corrélée d'une part, à la présence de micro-organismes comme les amibes (compte tenu de sa capacité à se répliquer à l'intérieur de ces protozoaires) et d'autre part, à la présence de biofilms multi-espèces :

- La capacité de *L. pneumophila* à se répliquer **à l'intérieur des amibes** est un mécanisme assez bien connu. Après être entrée dans l'amibe, la bactérie subit des changements physiologiques et phénotypiques ; elle

dispose de nutriments en quantité suffisante et se multiplie alors activement (phase répliquative). Après l'épuisement des nutriments, la bactérie va sortir de son hôte et être libérée dans l'environnement (phase transmissive). C'est le système « hôte-parasite ». Toutefois, il a été démontré dans certaines études que *L. pneumophila* pouvait se maintenir dans l'amibe pendant son enkystement¹¹⁹ - ce qui permettrait à la bactérie de résister à de nombreux stress (notamment, aux traitements biocides).

- Dans les réseaux d'eau, la majorité des micro-organismes adhère aux surfaces où se concentrent les nutriments pour y former **des biofilms**. Ces micro-colonies offrent de nombreux avantages pour les bactéries : abondance de nutriments, facilité de transferts horizontaux et protection vis-à-vis de différents stress (dont l'action de biocides).

Traitements biocides

Outre les traitements thermiques et la désinfection par UV¹²⁰, des traitements chimiques sont employés pour réduire le développement des légionelles en deçà des seuils réglementaires¹²¹. Ils sont souvent séparés en deux catégories :

- **Les biocides non oxydants**, il existe une grande variété de désinfectants organiques

Université de Poitiers, Laboratoire EBI, UMR CNRS 7267, Poitiers

¹¹⁹ Mode de défense de certains micro-organismes comme l'amibe caractérisé par la formation d'une coque ou d'une enveloppe ressemblant à un kyste.

¹²⁰ Plutôt utilisée pour le traitement des eaux usées afin d'éviter le rejet de résiduels polluants à la rivière.

¹²¹ Selon les principes de la Directive cadre européenne sur l'eau de l'année 2000.

destinés à lutter contre *Legionella*. Les plus utilisés sont les thiazolones, les amines halogénées et les aldéhydes.

- **Les biocides oxydants**, les molécules couramment utilisées sont des produits chlorés (ex. chlore, dioxyde de chlore, monochloramine) ou des produits bromés (ex. acide hypobromeux, bromure de sodium, bromure d'ammonium).

Toutefois, malgré l'application de tels traitements, *L. pneumophila* est capable de proliférer dans les installations industrielles ou dans les réseaux de distribution d'eau. Différents paramètres peuvent influencer sur l'efficacité du traitement ; aux paramètres physico-chimique conventionnels (ex. pH, matière en suspension, température) s'ajoutent des paramètres biologiques tels que les différents états physiologiques de *L. pneumophila*, la présence d'amibes dans l'eau ainsi que de biofilms.

“ *Malgré l'application de traitements biocides, Legionella pneumophila est capable de proliférer dans les installations industrielles ou dans les réseaux de distribution d'eau.* ”

De plus, les biocides et leurs sous-produits de dégradation, déversés dans les milieux naturels, ont également un impact néfaste sur l'environnement. Au-delà de la réglementation REACH, la tendance actuelle est de chercher à limiter le risque environnemental lié aux rejets chimiques (des traitements) par l'usage de composés d'origine biologique n'ayant que peu ou pas d'impact sur l'environnement et la santé humaine. Cependant, il n'existe pas encore d'alternative dans le domaine du traitement de l'eau et, *a fortiori*, pour le contrôle des légionelles.

Molécules naturelles anti-*Legionella*

Aujourd'hui, des molécules d'origine naturelle sont recherchées comme solution alternative dans la lutte contre *Legionella* ; ces molécules doivent être spécifiques de la cible et biodégradables mais aussi présenter un faible impact sur l'homme et l'environnement. Jusqu'à présent, peu de molécules ont été décrites dans la littérature. Il y a notamment des peptides/protéines, des huiles essentielles, des détergents et des antibiotiques.

Il a été aussi montré que certaines bactéries issues de la même niche écologique que *Legionella*, étaient capables d'inhiber la croissance de cette dernière. Si les bactéries du genre *Pseudomonas* apparaissent comme une source importante de composés anti-*Legionella*¹²², les molécules actives (produites par ces bactéries) ne sont toujours pas identifiées, à l'exception de quelques biosurfactants comme la surfactine (déjà utilisée en remédiation), qui présente des propriétés tensioactives et antimicrobiennes.

Le projet de recherche : ICarE

Le projet ICarE a pour objectif de caractériser de nouveaux agents d'origine naturelle, actifs contre *L. pneumophila*, en tenant compte de son comportement et de ses interactions au sein de son micro-environnement.

Méthodologie

La première phase du projet va consister à identifier et caractériser les souches productrices de molécules actives anti-*Legionella* et/ou anti-amibe à partir d'une collection de souches environnementales constituée de bactéries issues de différents types d'eaux douces dont des *Pseudomonas sp.*

Puis, les molécules d'intérêt produites par les souches les plus antagonistes seront purifiées, caractérisées et testées *L. pneumophila* dans différents états physiologiques (ex. phase répllicative, phase transmissive, intra-amibienne, en sortie d'amibes) mais également sur des amibes libres.

¹²² Le genre *Pseudomonas* représente environ 70% des bactéries testées.

Enfin, un spectre d'activité large sera réalisé pour chaque molécule d'intérêt, en déterminant sa concentration minimale inhibitrice (en microplaque) ainsi que son activité bactéricide/bactériostatique (par dénombrement), avant que leur efficacité soit testée contre des biofilms modèles mais aussi formés en eau naturelle. À ce stade, les mécanismes d'action seront analysés par une approche de biophysique ; puis, leurs activités anti-biofilms et leur cytotoxicité évaluées.

Les partenaires :**Julien VERDON**

Université de Poitiers, Laboratoire EBI, UMR CNRS 7267, Poitiers

Sophie LECOMTE

Université de Bordeaux, Institut de Chimie et Biologie des Membranes & des Nano-objets, UMR CNRS 5248, Pessac

Durée : 40 mois

Financement : 177.258 €

Contacts : julien.verdon@univ-poitiers.fr



La résistance aux anthelminthiques des strongles gastro-intestinaux

La résistance aux anthelminthiques des strongles gastro-intestinaux chez les petits ruminants laitiers élevés au pâturage

Carine PARAUD

Mots-clés : résistance traitement, anthelminthique, helminthe, petits ruminants, élevage laitier, caprin, parasitisme, médecine vétérinaire

Les strongles gastro-intestinaux sont des vers parasites qui affectent les animaux de rente élevés au pâturage. En raison des pertes de production liées à ces infestations, des traitements par des anthelminthiques sont mis en œuvre. Toutefois ces médicaments peuvent perdre de leur efficacité, les strongles devenant capables de résister à des doses d'anthelminthiques habituellement létales pour eux. La résistance aux anthelminthiques est un phénomène décrit au niveau mondial depuis de nombreuses années chez les petits ruminants vis-à-vis de plusieurs familles d'anthelminthiques (benzimidazoles, lévamisole et lactones macrocycliques). En France, la résistance aux benzimidazoles est particulièrement prévalente chez les petits ruminants. Un seul cas de résistance aux lactones macrocycliques a été décrit dans un troupeau ovin¹²³.



Chèvres au pâturage

Cette résistance, acquise sous la pression de sélection, est transmissible d'une génération parasitaire à l'autre et considérée comme quasiment irréversible au niveau d'une population. Elle survient

généralement une dizaine d'années après la mise sur le marché des anthelminthiques. C'est une résistance « de famille », c'est-à-dire que les strongles possédant la capacité de résister à une molécule sont aussi capables de résister à toutes les molécules de la même famille possédant le même mode d'action. Les parasites peuvent aussi devenir multi-résistants, c'est-à-dire résistants à plusieurs familles d'anthelminthiques.

Ce phénomène se manifeste le plus souvent de manière insidieuse, car il est peu visible par l'éleveur, et par conséquent difficile à repérer. Il est donc primordial d'améliorer le diagnostic de la présence de résistances en élevage.

Le diagnostic de la résistance

La première étape de la démarche sera d'écarter les causes d'inefficacité du traitement anthelminthique qui peuvent faire penser à tort à l'existence de résistance : erreur de diagnostic, sous-dosage de l'anthelminthique, modifications des paramètres pharmacocinétiques... Une fois les principales causes d'inefficacité écartées, différents éléments sont à la disposition du praticien pour explorer une suspicion de résistance.

Il peut être utile d'établir en premier lieu **un historique des pratiques de traitement** pour identifier des facteurs de risque de survenue de résistance (ex. utilisation de la même famille d'anthelminthiques sur de longues périodes, traitements répétés au cours de l'année et administrés à l'ensemble du troupeau).

¹²³ Cf. Liste des publications p. 58, article marqué *.

À ce jour, le test le plus simple d'utilisation sur le terrain et le plus compréhensible par les éleveurs est le test de réduction d'excrétion fécale (FECRT).

Il consiste à évaluer l'efficacité du traitement en comparant le niveau d'excrétion d'œufs, mesuré par coproscopie¹²⁴, avant et après traitement. Le pourcentage de réduction de l'excrétion d'œufs obtenu suite au traitement permet l'interprétation des résultats. Les recommandations de la WAAVP sont les suivantes : la résistance est présente si le pourcentage de réduction est inférieur à 95% et si la borne inférieure de l'intervalle de confiance est inférieure à 90%¹²⁵. Cependant, d'autres modes de calcul et d'autres interprétations ont été proposés et utilisés, ce qui traduit la non-standardisation de ce test. Ce test n'autorise qu'une détection tardive de la résistance, c'est-à-dire quand 25% des parasites adultes sont porteurs de la résistance. Des adaptations de ce test sont à l'étude, en particulier pour faciliter sa mise en œuvre en élevage et pour réduire les coûts et temps d'analyse, par l'utilisation de prélèvements et de coproscopie de groupe.

“ *L'accompagnement des éleveurs est nécessaire pour ne pas laisser se développer de multi-résistances, qui pourraient à terme menacer l'élevage de petits ruminants au pâturage.* ”

Différents tests *in vitro* ont été développés et plus ou moins standardisés, cependant ils ne sont pas utilisés en conditions de terrain à ce jour. Enfin, **le bilan parasitaire** permet de trancher, de façon

définitive, avec la mise en évidence de vers adultes survivants suite au traitement. Ce test, qui nécessite le sacrifice des animaux, est très rarement mis en œuvre. L'accompagnement des éleveurs est nécessaire pour ne pas laisser se développer de multi-résistances, qui pourraient à terme menacer l'élevage de petits ruminants au pâturage.

La gestion du parasitisme : enquête dans les troupeaux caprins laitiers en région Poitou-Charentes

La gestion du parasitisme par les strongles gastro-intestinaux est une problématique majeure chez les petits ruminants laitiers élevés au pâturage en raison de la faible disponibilité en médicaments disposant d'une AMM¹²⁶, des temps d'attente (TA)¹²⁷ existant pour le lait et de la forte prévalence des résistances. Ces difficultés ont été rapportées par la totalité des éleveurs caprins enquêtés.

En effet, dans le cadre de l'AMM au moment de l'enquête¹²⁸, seuls les benzimidazoles sont autorisés chez la chèvre pendant la lactation avec des temps d'attente qui étaient nuls jusqu'en 2014 et qui ont été allongés depuis, réduisant encore les possibilités de traitement en lactation¹²⁹.

Cette faible disponibilité de médicaments conduit à l'utilisation quasi-exclusive d'une ou de deux familles d'anthelminthiques ; ce qui est générateur de résistance vis-à-vis de ces familles, réduisant d'autant les possibilités de traitement. À titre d'exemple, quasiment 100% des élevages caprins hébergent des strongles résistants aux benzimidazoles – ces molécules ayant été utilisées de façon quasi-exclusive pendant de nombreuses années. Cette forte prévalence des résistances aux benzimidazoles explique la forte utilisation, dans le

¹²⁴ Dénombrement au microscope du nombre d'œufs présents dans les matières fécales.

¹²⁵ Selon les recommandations de la WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology). Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, s., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) *Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Veterinary Parasitology, 44, 35-44.

¹²⁶ Autorisation de mise sur le marché.

¹²⁷ Le temps d'attente est le temps à respecter entre la dernière administration du médicament à usage vétérinaire et la collecte des denrées alimentaires : ici, la période durant laquelle le lait ne peut pas être utilisé pour la consommation humaine.

¹²⁸ Une spécialité à base d'éprinomectine a obtenu une AMM pour les caprins en juillet 2016.

¹²⁹ De 8,5 à 14 jours selon les produits (ANMV, 2014).

cadre de la « cascade », de l'éprinomectine¹³⁰ (utilisée au moins 1 fois au cours des 3 dernières années par deux tiers des éleveurs enquêtés).

La grande variabilité de l'efficacité de l'éprinomectine par la voie percutanée a conduit à tester son efficacité lors d'une administration par voie orale. Si cette efficacité vis-à-vis des strongles intestinaux chez la chèvre a bien été démontrée en conditions expérimentales, la question de la sécurité pour le consommateur en termes de résidus dans le lait, en particulier des excipients lors de l'administration par voie orale de médicaments destinés à la voie percutanée, reste entière et ne permet pas de valider cette pratique à ce stade¹³¹.

L'utilisation de méthodes complémentaires

L'utilisation de méthodes complémentaires répond à la faible disponibilité de médicaments et à la nécessité de préserver l'efficacité des anthelminthiques, même si pour certains éleveurs, notamment en production biologique ou biodynamique, elle est guidée par des convictions personnelles. Ainsi, les éleveurs enquêtés rapportent utiliser une ou plusieurs de ces méthodes (citées par ordre décroissant d'utilisation) : pratique du pâturage tournant, mise à disposition de plantes riches en tanins condensés au pâturage ou l'auge, utilisation de plantes médicinales, aromathérapie, homéopathie. Or, à part les méthodes de gestion du pâturage et l'utilisation des plantes riches en tanins condensés, ces méthodes complémentaires sont plus ou moins bien éprouvées en termes d'efficacité et plus ou moins bien encadrées par la réglementation.

Des travaux supplémentaires sur la mise en évidence des résistances en élevage (standardisation des tests) et sur la gestion intégrée du parasitisme (utilisation raisonnée des anthelminthiques et des méthodes complémentaires) apparaissent donc nécessaires.

¹³⁰ Molécule présente dans une spécialité bovine autorisée chez la vache laitière en lactation avec un temps d'attente nul. Si la présence de résistance aux benzimidazoles est avérée dans un élevage caprin, un vétérinaire peut prescrire, en deuxième intention, dans le cadre du principe dit « de la cascade », une spécialité disponible dans une autre espèce-cible (ici, en l'occurrence, la vache laitière) pour cette même indication. Dans le cadre de cette prescription, le temps d'attente forfaitaire s'applique : 7 jours pour le lait.

¹³¹ Badie, C., Lespine, A., Devos, J., Sutra, J.F., Chartier, C., 2015. *Kinetics and anthelmintic efficacy of topical eprinomectin when given orally to goats*. *Veterinary Parasitology*, 209, 56-61.

Publications issues de ce projet

*Paraud, C., Marcotty, T., Lespine, A., Sutra, J.F., Pors, I., Devos, J., 2016. *Cross-resistance to moxidectin and ivermectin on a meat sheep farm in France*. *Veterinary Parasitology*, 226, 88-92.

Devos, J., Paraud, C., 2014. *Echec du traitement anthelminthique : est-ce de la résistance ? Le Point Vétérinaire*, 349, 56-58.

Paraud, C., Chartier, C., Devos, J., 2013. *Cas d'inefficacité de l'éprinomectine pour-on dans un élevage caprin*. *Bulletin des GTV*, 70, 97-103.

Paraud, C., Pors, I., Rehby, L., Chartier, C., 2010. *Absence of ivermectin resistance in a survey on dairy goat nematodes in France*. *Parasitology Research*, 106, 1475-1479.

Paraud, C., Kulo, A., Pors, I., Chartier, C., 2009. *Resistance of goat nematodes to multiple anthelmintics on a farm in France*. *Veterinary Record*, 164, 563-564.

Anses - Laboratoire de Niort :

Carine PARAUD
Parasitologie

Financement : Anses et région Nouvelle-Aquitaine

Contact : carine.paraud@anses.fr

Le suivi des antibiotiques en élevages

Gérard MOULIN et Jean-Pierre ORAND

Mots-clés : médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, antibiorésistance

L'Agence nationale du médicament vétérinaire, Anses-ANMV, réalise un suivi des ventes des médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques, en France, depuis 1999. Ce suivi permet d'évaluer l'utilisation de ces médicaments et de suivre l'évolution des pratiques en matière d'antibiothérapie chez les différentes espèces animales. Les informations recueillies sont l'un des éléments indispensables, avec le suivi de la résistance bactérienne, pour permettre une évaluation des risques liés à l'antibiorésistance.



Suivi des ventes
de médicaments
vétérinaires
contenant
des antibiotiques
en France en 2015

Rapport annuel

Octobre 2016 Édition scientifique



Ce suivi est réalisé avec la participation du Syndicat de l'industrie du médicament et réactif vétérinaires (SIMV) ; il est basé sur une déclaration annuelle des ventes d'antibiotiques par les laboratoires qui les commercialisent. En 2015, le volume total vendu en France est le plus faible enregistré depuis le début du suivi : 514,3 tonnes (contre 913,6 tonnes en 2011 et 1311 tonnes en 1999).

L'exposition aux antibiotiques

Les volumes de vente d'antibiotiques constituent un indicateur partiel. En effet, les antibiotiques récents sont généralement plus actifs et nécessitent l'administration d'une quantité plus faible¹³². Pour évaluer l'exposition des animaux à ces médicaments, il est nécessaire de prendre en compte la posologie et la durée d'administration, mais aussi l'évolution de la population animale au cours du temps.

Il convient donc bien de distinguer les indicateurs de « ventes » des indicateurs d'exposition. Pour estimer le niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques, on utilise un indicateur nommé « ALEA¹³³ » corrélé au pourcentage d'animaux traités par rapport à la population animale totale. Depuis 2011, cet indicateur a diminué de 20,1% en France¹³⁴. Une baisse de l'exposition a été observée pour toutes les espèces animales par rapport à cette même année : porcs (24,1%), volailles (22,1%), lapins (17,8%), bovins (9,5%), chats et chiens (9,5%).

Toutefois, la méthodologie mise en place dans le suivi des ventes d'antibiotiques ne permet pas de décrire précisément l'utilisation des antibiotiques ni d'affec-

Anses-ANMV

¹³² Ainsi, une diminution du volume des ventes ne traduit pas forcément une diminution de l'utilisation.

¹³³ De l'anglais, *Animal Level of Exposure to Antimicrobials*.

¹³⁴ 13,6% depuis le début du suivi.

ter les ventes par catégorie d'animaux, par stade physiologique. En particulier, il n'est pas possible de distinguer les veaux de boucherie des bovins adultes. De même, certaines espèces sont regroupées, c'est le cas par exemple pour les différentes espèces de volailles. Disposer de données plus précises sur l'utilisation des antibiotiques par espèce et catégorie d'animaux est une nécessité rappelée régulièrement au niveau européen.

“ *Disposer de données plus précises sur l'utilisation d'antibiotiques par espèce et catégorie d'animaux est une nécessité rappelée régulièrement au niveau européen.* ”

Recueil d'information par filière animale

Les mesures de l'axe 4 du premier Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire Écoantibio 2017 ont pour objectif de disposer d'éléments de réponse pour mieux documenter l'utilisation réelle des antibiotiques. Ainsi, l'Anses-ANMV a mis notamment en place un partenariat avec l'IFIP (Institut du porc) et un deuxième avec l'IDELE (Institut de l'élevage) pour recueillir des données liées aux usages d'antibiotiques en élevage :

- **La démarche GVET (Gestion des traitements VÉTérinaires)**

La démarche GVET répond à deux objectifs complémentaires : moderniser le registre des traitements et mesurer les usages d'antibiotiques en élevage. Bien que la traçabilité des traitements vétérinaires en élevage soit obligatoire depuis 2000, la quasi-totalité des éleveurs collecte ces informations sur papier, sous des formats disparates.

Dans le cadre du plan Ecoantibio 2017, qui recommandait notamment de créer des outils d'auto-évaluation des usages d'antibiotiques en élevage à destination des éleveurs et des vétérinaires, l'IFIP et l'Anses ont proposé aux éditeurs de logiciel un cahier des charges spécifique permettant de recueillir et de suivre l'utilisation des antibiotiques en élevage. Deux nouvelles bases de données ont été construites en lien avec cet outil informatique : un catalogue normalisé des médicaments autorisés en élevage et une base centralisant les registres des traitements ainsi collectés. Désormais, les modalités de traitement de chaque médicament sont proposées aux utilisateurs – ce qui permet un gain de temps, un confort et surtout, une plus grande précision.



Gestion informatique des traitements vétérinaires à l'élevage

De plus, deux nouveaux indicateurs sont à la disposition des éleveurs pour suivre leurs usages d'antibiotiques : le nombre de traitements et le nombre de jours de traitement par animal. Ces indicateurs sont déclinés en de multiples catégories, pertinentes pour l'analyse : par type d'animal, par voie d'administration, par famille de molécules antibiotiques ou par motif de traitement. Les éleveurs accèdent directement et de manière sécurisée aux résultats de leur élevage, sur la plateforme web de l'IFIP qui transmet ensuite les informations anonymisées à l'Anses. Une phase pilote impliquant des éleveurs volontaires est en cours cette année. La démarche GVET se veut ainsi être une occasion de transformer une contrainte réglementaire ancienne en une réelle opportunité technique et sanitaire. Ce qui permettra de produire des références françaises officielles sur les usages d'antibiotiques, pour réaliser notamment des études comparatives par rapport aux autres pays européens.

- ***L'observatoire pérenne des usages d'antibiotiques dans la filière veaux de boucherie***

L'IDELE et l'Anses ont été mandatés par l'organisation interprofessionnelle pour le bétail et la viande (INTERBEV) pour mettre en place, dans le cadre du plan Ecoantibio 2017, un observatoire pérenne visant à mesurer, de manière fiable, les quantités d'antibiotiques utilisées en élevages de veaux de boucherie. Testé auprès d'un panel d'éleveurs volontaires¹³⁵, cet outil permettra d'obtenir des données complémentaires de celles du rapport annuel des ventes Anses-ANMV et d'exprimer les résultats suivant différents indicateurs normalisés, à la fois simples et comparables. Les données recueillies seront également beaucoup plus représentatives et précises que les seules données existantes actuellement basées sur les ventes de médicaments.

Ces démarches pour disposer de réseaux pérennes permettant de mieux suivre l'utilisation des antibiotiques devront être étendues à d'autres espèces animales.

Le projet de révision de la réglementation communautaire en matière de médicament vétérinaire prévoit l'obligation pour les États membres de communiquer les données relatives au volume des ventes mais aussi à l'utilisation des médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques à l'Agence Européenne du médicament.

La mise en place de réseaux pérennes par filière permettant de collecter des informations par filière animale devrait permettre à la France de répondre aux futures exigences réglementaires.

¹³⁵ Éleveurs du réseau de référence « *veau de boucherie* » piloté par le GIE Élevages de Bretagne et animé par l'IDELE et la Chambre régionale d'Agriculture de Bretagne.


Glossaire
A

Ac	Anticorps.
Acétylcholine	Substance qui intervient dans le fonctionnement du système nerveux. Elle transmet un signal d'un neurone à l'autre. Une fois le signal transmis, elle est détruite par une enzyme (l'acétylcholinestérase) en quelques millisecondes.
Adjuvant	Substance ou préparation destinée à être mélangée par l'utilisateur avec un produit phytopharmaceutique et qui renforce son efficacité ou d'autres propriétés pesticides.
ADN	Acide désoxyribonucléique : molécule constitutive des chromosomes et porteuse de l'information génétique.
<i>Aedes albopictus</i>	Moustique-tigre.
AIC	Antibiotiques d'importance critique : médicaments utilisés en médecine vétérinaire dont la liste est établie par arrêté ministériel en application des articles R. 5141-117-1 et R. 5141-117-2 du code de la santé publique. Leur utilisation est restreinte.
ALEA	Niveau d'exposition de l'animal aux antibiotiques. De l'anglais, <i>Animal level of exposure to antimicrobials</i> .
Allèle	Variante d'un gène, issue d'une mutation, qui favorise souvent l'apparition de nouveaux caractères héréditaires.
Amendement organique	Substance organique ou minérale incorporée au sol en quantité notable pour le rendre plus fertile.
AMM	Autorisation de mises sur le marché (accordée par l'Etat ou une agence selon la nature du produit concerné).
Aneugène	Se dit d'un agent dangereux, susceptible de provoquer des anomalies dans le nombre de chromosomes.
Anion	Ion qui possède une ou plusieurs charge(s) électrique(s) négative(s).
ANMV	Agence nationale du médicament vétérinaire.
Antibiogramme	Examen de laboratoire permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie prélevée chez un organisme malade vis-à-vis de divers antibiotiques.
Antibiorésistance	L'antibiorésistance est le phénomène naturel de défense des bactéries en réponse à l'action exercée par l'antibiotique. Certaines bactéries auparavant sensibles à l'antibiotique ne sont plus détruites ou leur multiplication n'est plus arrêtée. C'est la bactérie qui devient résistante et non pas l'homme ou l'animal.
Antibiotiques	Les antibiotiques sont des substances naturelles ou de synthèse capables de détruire ou d'arrêter la multiplication des bactéries. Lorsqu'ils sont contenus dans des médicaments, ils permettent de traiter des maladies humaines et animales d'origine bactérienne. Ils n'ont en revanche aucune action contre les virus.
Apoptose	Processus d'autodestruction d'une cellule en réponse à un signal.
Arbovirose	Maladie à arbovirus (de l'anglais, <i>arthropodborne virus</i>). Appartiennent à cette catégorie, la dengue, le chikungunya et la fièvre Zika. Ces maladies peuvent être transmises par les piqûres de moustiques.
Arbovirus	Virus transmis par les arthropodes (Ex : moustiques, tiques...).
Arthropode	Animal invertébré dont le corps est segmenté et recouvert d'un squelette externe (cuticule) résistant et imperméable (Ex. araignée, crabe, moustique, punaise, scorpion, tique...).

B

Bactérie	Les bactéries sont des organismes vivants à une cellule, dont la taille est de l'ordre du milliardième de mètre. Elles sont omniprésentes, y compris à l'intérieur du corps. Certaines d'entre elles peuvent causer des maladies.
Biofilm	Communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, etc.) adhérant entre eux, fixée à une surface et caractérisée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.
Biomarqueur	Un biomarqueur d'exposition est une caractéristique biologique mesurable qui révèle

	l'exposition présente ou passée d'un individu à une substance chimique. Un biomarqueur d'effet est la "signature biologique" d'un impact de cette substance.
Biopesticide	Contraction de pesticide biologique. Utilisation d'organismes vivants pour la lutte biologique. Un exemple classique est <i>Bacillus thuringiensis</i> une bactérie qui produit une molécule insecticide.
BLSE	β -lactamase à spectre élargi. Se dit d'une enzyme qui hydrolyse certaines molécules antibiotiques (les pénicillines et les céphalosporines) appartenant à la famille des β lactamines.
BMR	Bactérie multi-résistante.
C	
C3G	Céphaslosporines de 3ème génération.
C4G	Céphaslosporines 4ème génération.
Catalyse	Accélération d'une réaction chimique par une substance (catalyseur) qui intervient dans la réaction et qui est régénérée à la fin de celle-ci.
Chikungunya	Le chikungunya (ou la maladie de celui « qui marche courbé en avant ») provoque fièvre et douleurs articulaires (petites articulations des extrémités des membres, ex. poignet, doigt, cheville), qui peuvent être souvent invalidantes. À ces douleurs, s'ajoutent aussi des maux de tête, des douleurs musculaires et des éruptions cutanées.
Clastogène	Se dit d'un agent dangereux, susceptible de provoquer des cassures de chromosomes.
Codex Alimentarius	Le Codex Alimentarius, ou «Code alimentaire», a été créé par la FAO et l'OMS en 1963 afin de mettre au point des normes alimentaires internationales harmonisées destinées à protéger la santé des consommateurs.
Coformulants	Substances ou préparations qui sont utilisées ou destinées à être utilisées dans un produit phytopharmaceutique ou un adjuvant, mais qui ne sont ni des substances actives ni des phytoprotecteurs ou des synergistes.
Commensale	Se dit d'un microorganisme présent sur (ou dans) l'organisme sans lui porter préjudice.
COV	Composés Organiques Volatils.
CTX-M	Céfotaximase-Munich : enzyme de la famille des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE).
Cytotoxicité	La cytotoxicité est la propriété d'une substance d'altérer les cellules, voire de les détruire (ex. un médicament cytotoxique).
D	
dCAPS	De l'anglais, <i>Derived cleaved amplified polymorphic sequences</i> : technique d'analyse de l'ADN permettant de détecter la présence d'une mutation en un site précis de l'ADN.
Dengue	La dengue (prononcez « dingue »), aussi appelée « grippe tropicale » se manifeste « classiquement » par l'apparition brutale d'une forte fièvre (>38,5°C.), accompagnée de maux de tête et de douleurs articulaires et musculaires. Surviennent également d'autres symptômes (ex. éruptions cutanées, nausées, vomissements) qui peuvent éventuellement s'intensifier pour des raisons méconnues et mettre en jeu le pronostic vital (au moins 2,5% des cas selon l'OMS). C'est l'arbovirose la plus répandue dans le monde.
DGAL	Direction générale de l'alimentation (direction d'administration centrale auprès du Ministère de l'agriculture).
DROM-COM	Cette appellation désigne les Départements ou Régions français d'Outre-Mer (DROM) et les Collectivités d'Outre-Mer (COM) ; elle remplace l'ancienne appellation DOM-TOM (réforme constitutionnelle de 2003).
E	
EAG	Electro-antennographie. Méthode pour mesurer le signal électrique émis par l'antenne d'un insecte en réponse à une odeur.
EAT	Étude de l'alimentation totale. Lors de la 2ème étude de l'alimentation totale française, près de 20.000 produits alimentaires ont été collectés et 445 contaminants étudiés (Anses, juin 2011) : https://www.anses.fr/fr/content/les-%C3%A9tudes-de-l'alimentation-totale-eat .
EGS	Extraits de glandes salivaires.

ELISA	De l'anglais, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> : littéralement, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée. Cette technique permet de doser un anticorps.
EMA	Agence européenne des médicaments.
Endotoxines	Les endotoxines (du grec : <i>éndon</i> , "à l'intérieur" et <i>toxicon</i> , "poison") sont situées dans la membrane externe de certaines bactéries Gram négatif. Lorsque la bactérie est détruite, ces toxines libérées peuvent entraîner une réponse de l'organisme : réaction de type inflammatoire susceptible de provoquer un choc septique.
<i>Escherichia coli</i>	La bactérie <i>Escherichia coli</i> (E. coli) est naturellement présente parmi la microflore digestive de l'Homme et des animaux à sang chaud. Certaines souches d'E. coli sont pathogènes parmi lesquelles les E. coli entérohémorragiques ou EHEC. Chez l'Homme, les EHEC sont responsables de troubles variés allant d'une diarrhée bénigne à des formes plus graves comme des diarrhées hémorragiques et/ou des atteintes rénales sévères appelées syndrome hémolytique et urémique principalement chez le jeune enfant.
Ethologie	L'éthologie (du grec <i>ethos</i> , « mœurs » et <i>logos</i> , « science ») étudie les comportements des animaux, y compris l'homme, dans leur environnement (ex. milieu naturel, environnement domestique, conditions expérimentales).
F	
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.
FECRT	De l'anglais, <i>Fecal egg count reduction test</i> : test de réduction du nombre d'œufs présent dans les fèces. Ce test permet de mesurer le taux de nématodes qui infestent un animal et, de là, leur résistance à un traitement.
FET	De l'anglais, <i>Toxic Equivalency Factor</i> : facteur d'équivalence toxique; exprime la toxicité d'une molécule par rapport à une molécule de référence.
Fièvre Zika	La maladie à virus Zika se manifeste par divers symptômes cliniques peu spécifiques, qui évoquent ceux de la grippe ou encore de la dengue ou du chikungunya. La maladie est le plus souvent bénigne mais elle peut, lorsqu'elle est transmise à une femme enceinte, provoquer des malformations sévères du fœtus (ex. microcéphalie).
Fitness	Potentiel reproducteur.
Formulant	Substance ou préparation dépourvue d'activité biologique propre, incluse dans une préparation phytopharmaceutique ou biocide lors de la formulation afin de lui conférer les propriétés nécessaires à sa mise en œuvre.
Formulation	Combinaison d'une (de) substance(s) active(s) et de formulants destinée à faciliter l'application d'un pesticide et la rendre efficace dans le but recherché.
G	
Génotoxicité	Capacité d'une substance à induire des modifications physiques ou fonctionnelles dans un génome.
Génotoxique (ou mutagène)	Action toxique localisée sur le patrimoine génétique. C'est un agent qui augmente l'apparition de mutations. Une mutation est une modification permanente du nombre ou de la structure du matériel génétique dans un organisme, notamment l'ADN, molécule constitutive des chromosomes et porteuse de l'information génétique. Une exposition à ce type d'agent peut induire des défauts génétiques héréditaires.
GRA	Gène de résistance aux antibiotiques.
GVET	Gestion informatique des traitements VÉTérinaires à l'élevage.
H	
Hématophage	Se nourrissant de sang.
I	
IDELE	Institut de l'élevage.
IFIP	Institut du porc.
Immunoglobuline G (IgG)	Une des protéines du système immunitaire connue sous le nom d'anticorps.
Incidence d'incidence) (Taux	L'incidence mesure le risque de survenue d'une maladie ou de tout autre événement dans une population donnée. Il est calculé en divisant le nombre de nouveaux cas dans une population spécifique, durant une période de temps connue, par la population au début de la période. Il s'exprime en nombre de cas pour 100.000 personnes en précisant la période d'observation.
Infections nosocomiales	Les infections nosocomiales sont toutes les infections contractées dans un établissement de santé.

Isolat	L'isolat désigne une espèce complètement isolée, au sein de laquelle n'existe aucun échange génétique avec le reste du monde. En biologie médicale, par exemple, c'est un fragment d'organe (ex. tissu organique) isolé à des fins d'examen histopathologique et/ou pour être cultivé <i>in vitro</i> .
K	
Kairomone	Une kairomone est une substance volatile ou mobile, produite dans l'air, l'eau ou le sol par un être vivant. Libérée dans l'environnement, elle a une valeur de signal (sémiachimique) ; elle permet, par exemple, à des prédateurs ou des parasites de localiser leur proie ou hôte.
"Knock-down" (KD)	Certains insecticides « assomment » littéralement un insecte. On parle d'effet " <i>Knock-down</i> ".
"Knock-down resistance" (KDR)	Résistance à l'effet de choc (mutation fréquente chez les insectes).
L	
LAV	Lutte anti-vectorielle, cf. <i>Vecteur</i> .
<i>Legionella pneumophila</i>	Bactérie qui appartient au genre des <i>Legionella</i> , susceptible de coloniser les amibes en milieu aquatique. On peut les retrouver dans les réseaux d'eau chaude ou les tours aéroréfrigérantes. Cf. <i>Légionellose</i> .
Légionellose	Pneumonie grave provoquée par un bacille <i>Legionella pneumophila</i> . Les manifestations cliniques sont celles d'un état grippal accompagné, dans de nombreux cas, de troubles gastro-intestinaux, neurologiques et d'insuffisance rénale passagère. Les principales sources de contamination par le bacille sont des condensateurs à évaporation des systèmes de refroidissement et l'eau stagnant dans les pommes de douche ou dans les circuits d'alimentation des équipements de balnéothérapie.
LNR	Laboratoire national de référence.
LPS	Lipopolysaccharide: molécule présente à la surface des bactéries à Gram négatif.
M	
Mcr	De l'anglais, <i>Mobilized colistin resistance</i> : gène qui confère à une bactérie la capacité de résister à l'antibiotique colistine.
Métabolisme	Ensemble de transformations et processus biochimiques subis par une ou des substances dans une cellule ou un organisme.
Microbiote	Le microbiote est un ensemble des micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) vivant dans milieu bien déterminé (appelé microbiome), ex. microbiote intestinal.
MLST	<i>Multi locus sequence typing</i> : technique de biologie moléculaire fondée sur l'analyse de l'ADN sur plusieurs sites et qui permet de différencier diverses souches de bactéries.
Mycotoxines	Les mycotoxines sont des toxines libérées par diverses espèces de champignons microscopiques telles que les moisissures, ex. <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , etc.
O	
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économique.
OGM	Organisme génétiquement modifié.
OMS	Organisation mondiale de la Santé.
P	
PACA	Région Provence-Alpes-Côte d'Azur.
Pathogène	Du grec pathos qui signifie "maladie, infection" et genês qui veut dire "engendrer", donc qui peut engendrer une maladie.
PCR	PCR est l'acronyme anglais de "Polymerase Chain Reaction", c'est-à-dire réaction de polymérisation en chaîne. C'est une technique réalisée <i>in vitro</i> qui permet de dupliquer les brins d'ADN. A partir d'un simple fragment d'ADN on peut obtenir un grand nombre de copies identiques.
Pesticides	Les pesticides (étymologiquement « tueurs de fléaux ») sont des produits obtenus le plus souvent par synthèse chimique, dont les propriétés toxiques permettent de lutter contre les organismes nuisibles. D'un point de vue réglementaire, on distingue les pesticides

	utilisés principalement pour la protection des végétaux que l'on appelle produits phytopharmaceutiques (Directive 91/414/CEE) ou plus communément produits phytosanitaires, les produits biocides (définis dans la directive 98/8/CE), et les antiparasitaires à usage humain et vétérinaire (Directives 2004/27/CE et 2004/28/CE).
Pharmacovigilance	L'objectif de la pharmacovigilance est de pouvoir détecter le plus rapidement possible tout signal émergent, qu'il s'agisse d'un effet indésirable inattendu, ou bien attendu mais dont la fréquence ou la gravité est inattendue et de prendre ensuite les mesures adéquates de gestion du risque, pouvant aller de l'ajout d'une précaution d'emploi au retrait de l'autorisation de mise sur le marché (AMM).
Plasmide	Molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique (ou indépendante du génome bactérien).
Peptide	Molécule formée de plusieurs acides aminés.
pH	Potentiel hydrogène : indice de l'acidité ou de l'alcalinité d'une solution.
POC	De l'anglais, Point of care : Lieu d'intervention près du patient.
Produit phytosanitaire ou phytopharmaceutique	(également appelé spécialité phytosanitaire ou phytopharmaceutique) : préparations contenant une ou plusieurs substances actives, présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur. Les produits phytosanitaires sont destinés à protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, exercer une action sur les processus vitaux des végétaux (à l'exception des substances nutritives), assurer la conservation des produits végétaux, détruire les végétaux indésirables ou détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.
Produits antiparasitaires	Ils comprennent les rodenticides utilisés pour lutter contre les souris, les rats ou autres rongeurs, les avicides pour lutter contre les oiseaux, les molluscicides utilisés pour lutter contre les mollusques, les piscicides utilisés pour lutter contre les poissons ; les insecticides, acaricides et produits utilisés pour lutter contre les autres arthropodes, les répulsifs et appâts.
Prophylaxie	Ensemble de moyens médicaux mis en œuvre pour empêcher l'apparition, l'aggravation ou la propagation d'une maladie.
Protozoaire	Microorganisme unicellulaire.
Pulvérisation intra-domiciliaire	Pulvérisation des murs intérieurs d'habitations avec un insecticide pour tuer les vecteurs de maladies.
Q	
Qil	De l'anglais, <i>Quinone inside inhibitors</i> (inhibiteurs internes de la quinone).
Qol	De l'anglais, <i>Quinone outside inhibitors</i> (inhibiteurs externes de la quinone).
R	
RAM	Résistance aux antimicrobiens.
Ratio de résistance (RR)	Le ratio de résistance "RR90" désigne par exemple, à l'issue d'un test en laboratoire, le rapport entre la dose létale correspondant à 90% de mortalité chez les moustiques « sensibles » et la dose létale correspondant à 90% de mortalité chez les moustiques « résistants ».
RCP	Tous les produits pharmaceutiques ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché ont un RCP (résumé des caractéristiques du produit). C'est un ensemble d'informations plus particulièrement destiné au professionnel de santé et constituant une des annexes de la décision d'AMM.
RFLP	De l'anglais, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> : certains enzymes (dits de restriction) coupent les molécules d'ADN à des endroits bien déterminés. Lorsque des molécules d'ADN donnent des fragments différents, cela veut dire qu'elles sont différentes. Ce polymorphisme (variabilité) des fragments permet de différencier des molécules d'ADN.
S	
SEDIF	Syndicat des Eaux de l'Île de France.

Sensille	Structure sensorielle (ex. poil) présente chez les insectes et autres arthropodes.
SIMV	Syndicat de l'industrie du médicament et réactif vétérinaires.
Spécialité commerciale (ou préparation)	Mélange ou solution composée de deux ou plusieurs substances, dont au moins une substance active, destinée à être utilisée comme produit phytopharmaceutique.
SSR	Technique d'électrophysiologie qui mesure la réponse des neurones olfactifs contenus dans une sensille à des molécules odorantes (de l'anglais, <i>Single Sensillum Recording</i>).
STEP	Station d'épuration.
STEU	Site de traitement des eaux usées.
Substances actives	Substances ou micro-organismes, y compris les virus, exerçant une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux.
Support de culture	Matériau permettant l'ancrage des racines de la plante et la circulation des substances fertilisantes, jouant ainsi le rôle de support.
Synergiste	Substance ou préparation qui peut renforcer l'activité de la ou des substances actives présentes dans un produit phytopharmaceutique, Les effets de l'association de la substance active et du synergiste sont supérieurs à la somme des effets individuels de chacun des composants.
Systémique	Qualifie une substance capable après pénétration dans la plante de migrer à l'intérieur de celle-ci.
T	
TAR	Tour aéroréfrigérante.
Temps d'attente (TA)	Temps à respecter entre la dernière administration d'un médicament à usage vétérinaire et la collecte des denrées alimentaires (ex. lait).
Toxicité	Capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue la toxicité aiguë, la toxicité subaiguë et la toxicité chronique.
Toxicité bactérienne	Aptitude à produire des molécules toxiques pour l'hôte, à savoir des endotoxines qui sont caractéristiques de l'espèce et/ou des exotoxines sécrétées à l'extérieur de la bactérie.
Tropisme	Tendance d'un organisme (ex. plante) à croître dans une direction donnée : vers le bas ou vers la lumière.
U	
UFC/l	Unité formant colonie par litre d'eau: Unité de mesure qui permet de définir la concentration en bactéries dans un milieu. On compte celles qui peuvent, une fois déposées sur un milieu nutritif, former des colonies (visibles donc faciles à compter).
UHT	Upérisation à Haute Température (ex. lait de longue conservation).
UV	Rayonnement ultraviolet.
V	
Vecteur	Intermédiaire animal lors de la transmission d'une infection. Cela peut être des moustiques, des mouches, des mollusques, des rongeurs, etc. Par exemple, le paludisme est transmis par la piqure d'un moustique infecté. Pour combattre les maladies transmises par des vecteurs, on tente d'éradiquer le vecteur. On parle de lutte anti-vectorielle.
Virus	Le virus est une entité biologique « simple » composée d'une molécule porteuse d'information génétique (ADN ou ARN) et d'une paroi. Pour se multiplier, il utilise la machinerie génétique de cellules d'un hôte végétal, animal ou humain. Les virus sont à l'origine de nombreuses maladies humaines (rage, variole, grippe, sida, herpes...).
W	
WAAVP	World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology.
Z	
Zoonose	Toute maladie infectieuse pouvant se transmettre à partir de l'animal (sauvage ou domestique) à l'homme quel que soit l'agent qui la déclenche (bactéries, parasites, prions...).

Mentions légales

Ce dossier a été réalisé par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) dans le cadre de l'animation et de la valorisation du Programme National de Recherche en Environnement-Santé-Travail (PNR EST).

Nous remercions l'ensemble des contributeurs, et plus particulièrement Marthe-Louise Boye, Paulina Cervantès, Fabrice Coutureau, Isabelle Deportes, Hélène Desqueyroux, Laëtitia Dubois, Michel Dukhan, Aude Estève-Guérin, James Gathany, Catherine Gourlay-France, Sophie Guitton, Delphine Lascar, Gérard Lasfargues, Louis Laurent, Céline Leterq, Jean-Yves Madec, Alima Marie, Jean-Nicolas Ormsby, Aurélie Pajon, Pascale Parisot, Sophie Parel, Marc Savey, Elena Séité, Anne Tilloy, Jaqueminie Vialard.



Directeur de la publication :

Roger GENET (Directeur général, Anses)



Conception et réalisation :

Nathalie RUAUX (Direction Recherche et Veille, Anses)




Remerciements pour les crédits photographiques :

Sauf mention contraire, les illustrations proviennent de la banque d'images Getty. Les photographies fournies par les chercheurs sont libres de droit et/ou disponibles selon les termes de la *Creative Commons Paternité version générique 2.0* ou versions ultérieures (inspirés des termes de la GNU Free Documentation Licence) : <http://creativecommons.org/licenses/>

« *Penicillin saves soldiers' life* » (entre 1942 et 1945) par Chemical Heritage Foundation, Domaine public, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=31974607>

« *Thanks to penicillin... He will come home* » (1944) Copyright policy - Open access, https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4131211_2047-2994-2-31-1&req=4



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr  @Anses_fr

