

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2005 - Thèse n° 73

EVALUATION DE L'ACTIVITE DE LA SPIRAMYCINE SUR DES COQUES A GRAM POSITIF ISOLES LORS D'INFECTIONS MAMMAIRES CHEZ LA VACHE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 9 septembre 2005
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

PERIER Christophe
Né le 10 avril 1980
à Lyon 9^{ème}



DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉINAIRE DE LYON

Directeur : Stéphane MARTINOT

DEPART SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉINAIRE Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y RICHARD	G BOURDOISEAU G CHANTEGRELET	A LACHERETZ M ARTOIS P DEMONT C VERNOZY A LACHERETZ	V. GUERIN-FAUBLEE 90 % A. KODJO D. GREZEL J. VIALARD MP CALLAIT CARDINAL L. ZENNER A. GONTHIER P. SABATIER M.L. DELIGNETTE 80 % K. CHAL-VET-MONFRAY	S. COLARDELLE ISPV		
Pathologie infectieuse							
Parasitologie & Maladies parasitaires	MC CHAUVÉ						
Qualité et Sécurité des Aliments							
Législation & Jurisprudence							
Bio-Mathématiques							
DEPART DES ANIMAUX DE COMPAGNIE							
Anatomie	E CHATELAIN		T ROGER	S. SAWAYA	R. DA ROCHA CABARO	MCC	BENREDOUANE K N GAY J GOUJON
Chirurgie et Anesthésiologie	J P GENEVOIS		D FAU E VIGUIER D REMY		G CHANOIT S JUNOT K PORTIER C DECOSNE-JUNOT	MCC MCC MCC MCC	C CAROZZO
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie/ Hématologie	J P MAGNOL C FOURNEL		C FLEURY		D WATRELOT-VIRIEUX P BELLI D. PIN M HUGONNARD	MCC MCA MCA MCC	I BUBLOT C CALETT C ESCRIOU
Médecine interne	J L CADORE				J. SONET	MCC	F DURIEUX
Imagerie médicale							
DEPART DES PRODUCTIONS ANIMALES							
Zootéchnie, Ethologie & Économie rurale	M FRANCK				P LETERME		L MOUNIER
Nutrition et Alimentation					D. GRANCHER L. ALVES de OLIVEIRA G. EGRON-MORAND S. BUFF P. GUERIN		
Biol & Patho de la Reproduction	F BADINAND		M RACHAIL-BRETIN		R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D LE GRAND		N GRAUD P DEBARNOT D LAURENT
Patho Animaux de Production	P BEZILLE		T ALOGNINOUIWA			MCA	
DEPART SCIENCES BIOLOGIQUES							
Physiologie / Thérapeutique	R BOIVIN				J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN 90 % T BURONFOSSE V. LAMBERT		
Biophysique / Biochimie	F GARNIER		E BENOIT F GRAIN				
Génétique et Biologie moléculaire	G KECK		P JAUSSAUD P BERRY		C FARMER R SULLIVAN	IPAC IPAC	
Pharmacie / Toxicologie Législation du Médicament							
Langues							
DEPART HIPPIQUE							
Pathologie équine	JL CADORE O. LEPAGE		C FLEURY	A LEBLOND A. BENAMOU-SMITH			
Clinique équine							
F. vertue nécrapsique							

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Flandrois,

De la Faculté de médecine de Lyon-Sud,

Qui m'a fait l'honneur de m'accueillir au sein du laboratoire de bactériologie et de présider cette thèse.

Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Guérin-Faublée,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

Qui m'a fait l'honneur de me proposer et d'encadrer cette thèse. Que vous trouviez ici toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements, à la hauteur de votre investissement et de votre gentillesse déployés pour ce travail.

A Monsieur le Docteur Guérin,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

Qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury,

Sincères remerciements.

A toute l'équipe du laboratoire de bactériologie,

Catherine, Ghislaine, Christiane et Marie,

Sincères remerciements.

A papa et maman,

Pour votre soutien et votre présence permanente, aux valeurs que vous m'avez transmises, merci de m'avoir permis de réaliser ce merveilleux métier. Cette thèse est le fruit de ma reconnaissance.

A ma petite sœur, Audrey, et mon frère Cédric,

Mon équilibre passe également par vous, en espérant que l'on partage encore de merveilleux moments ensemble.

A ma famille : mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines,

Je me sens si bien lorsque je vous retrouve !

Aux souvenirs du lycée Branly : Doud, Pierrot, Beau gosse, Guillaume, Mickaël, Romain,

Prenez 3 années d'internat, ajoutez les sorties du week-end enflammées avec de joyeux lurons, et vous obtenez une tranche de vie inoubliable !

Aux « Maaaaooooooooohs » : Llaume, Olivier, Seb, Lul, Ben, Emilie, Sophie, Lolotte, Caro,

Je ne compte plus les fous rires et autres pitreries avec vous, témoins de ma franche amitié.

A deux amis d'enfance, Jean-Serge et Baptiste,

Aux gens de la prépa véto et de l'école : Brice, Clément, Baïne et Baloche (supporters marseillais...), Pignon, Laurence, Maud, Goupil, Bertrand, Corinne, Perrine, Ericka,

A tous les vétos qui m'ont accueilli ainsi qu'à leur(s) personnel(s), merci de m'avoir transmis votre expérience, votre passion a été contagieuse ! : Drs Soulat, Lewandovsky, Lafay, Buisson, Perrin, Delacroix, Mamière, Butsaren, Dort, Bellon J.,

Et plus spécialement, *aux Drs Bellon Christophe et De Blander Cécile*, pour votre sympathie et votre accueil chaleureux en terres nivernaises,

Et à la famille Sattler, pour votre gentillesse ainsi qu'à la clinique de St Vallier de Bellechasse, où j'ai découvert l'hospitalité et la convivialité québécoise,

A tous ceux que j'aurais oublié, que vous m'en excusiez...

A mon Amour, Emmanuelle, tu t'es montrée patiente et attentionnée lors de ce travail, ta joie de vivre me séduit chaque jour,

TABLE DES MATIERES

EVALUATION DE L'ACTIVITE DE LA SPIRAMYCINE SUR DES COQUES A GRAM POSITIF ISOLES LORS D'INFECTIONS MAMMAIRES CHEZ LA VACHE.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
I. PHARMACIE CHIMIQUE DE LA SPIRAMYCINE.....	14
A. STRUCTURE.....	14
B. ORIGINE.....	15
C. PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES.....	15
1) <i>Propriétés physiques (Sanders, 1992)</i>	15
2) <i>Propriétés chimiques</i>	15
a) Stabilité.....	15
b) Caractère basique.....	16
c) Préparation de sels.....	16
II. MODE D'ACTION DE LA SPIRAMYCINE.....	17
III. SPECTRE D'ACTIVITE ET UTILISATION THERAPEUTIQUE DE LA SPIRAMYCINE.....	18
A. SPECTRE D'ACTION.....	18
B. UTILISATION THERAPEUTIQUE DE LA SPIRAMYCINE.....	20
IV. PROPRIETES PHARMACOCINETIQUES DE LA SPIRAMYCINE.....	23
V. MECANISME DE RESISTANCE DES COQUES A GRAM POSITIF AUX MACROLIDES, LINCOSAMIDES ET STREPTOGRAMINES.....	30
A. STAPHYLOCOQUES.....	31
1) <i>Modification de la cible (phénotype MLS_B) (Leclercq et Courvalin, 1991)</i>	31
2) <i>Inactivation enzymatique</i>	32
a) Lincosamides (phénotype L).....	32
b) Streptogramines.....	32
c) Macrolides.....	33
3) <i>Efflux actif</i>	33
4) <i>Reconnaissance des phénotypes de résistance</i>	33
B. STREPTOCOQUES (NAKAJIMA, 1999 ; LECLERCQ, 2000 ; LECLERCQ, 2002).....	35
1) <i>Modification de la cible (phénotype MLS_B)</i>	35
2) <i>Efflux actif (phénotype M)</i>	36
3) <i>Résistance par mutation des cibles</i>	37
VI. RESISTANCE AUX MACROLIDES ET APPARENTES DES COQUES A GRAM POSITIF RESPONSABLES D'INFECTIONS MAMMAIRES CHEZ LA VACHE.....	38
A. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	38
B. <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	39
C. <i>STREPTOCOCCUS DYS GALACTIAE</i>	40
D. MECANISMES DE RESISTANCE.....	40
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.....	43
I. MATERIELS ET METHODES.....	45
A. SOUCHES BACTERIENNES.....	45
1) <i>Souches cliniques</i>	45

2)	<i>Souches de référence</i>	47
a)	Contrôle de qualité de l'antibiogramme	47
b)	Identification <i>S. uberis</i> / <i>S. parauberis</i>	47
3)	Conservation	47
B.	IDENTIFICATION DE <i>S. UBERIS</i> ET <i>S. PARAUBERIS</i>	47
1)	<i>Souches bactériennes</i>	48
2)	Extraction de l'ADN chromosomique	49
3)	Amplification du fragment 16S : technique de PCR	50
4)	Détection des produits amplifiés par électrophorèse	52
5)	Séquençage	53
C.	MESURE DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI)	53
1)	Antibiotiques	54
2)	Milieu de culture	55
3)	Préparation de l'inoculum	55
4)	Ensemencement	56
5)	Incubation	56
6)	Lecture	56
7)	Contrôle de qualité	57
8)	Interprétation : catégorisation clinique	58
D.	ANTIBIOGRAMMES PAR DIFFUSION : TECHNIQUE DES DISQUES	59
1)	Antibiotiques	60
2)	Milieu de culture	60
3)	Inoculum	60
4)	Ensemencement et dépôt des disques	60
5)	Incubation	61
6)	Lecture	61
7)	Contrôle de qualité	61
8)	Catégorisation clinique	62
E.	CARACTERISATION D'UN MECANISME D'EFFLUX D'UN ANTIBIOTIQUE	63
1)	<i>Souches bactériennes</i>	63
2)	Antibiotiques	64
3)	Inhibiteurs de pompes d'efflux	64
4)	Mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices	64
F.	CARACTERISATION D'UN MECANISME D'INACTIVATION D'UN ANTIBIOTIQUE : TEST DE SATELLITISME DE GOTS	65
1)	<i>Souches bactériennes</i>	65
2)	Antibiotiques	66
3)	Milieu de culture	66
4)	Technique	66
II.	RESULTATS	67
A.	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	67
B.	<i>STREPTOCOQUES</i>	73
1)	Profils de résistance aux macrolides et apparentés des souches de <i>S. uberis</i>	74
2)	Etude des souches de <i>S. uberis</i> de phénotype « résistance de bas niveau » à la spiramycine	79
3)	Etude des souches de <i>S. uberis</i> résistantes à bas niveau à la lincomycine	84
III.	DISCUSSION	85
CONCLUSION	91	
BIBLIOGRAPHIE	97	

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

TABLEAU I : CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS COMPOSES DE LA SPIRAMYCINE (SANDERS, 1992),	15
TABLEAU II : LES DIFFERENTES FORMES DE LA SPIRAMYCINE EN SANTE ANIMALE (SCHUMACHER, 1992),.....	16
TABLEAU III : ACTIVITE <i>IN VITRO</i> DE LA SPIRAMYCINE (BRYSKIER ET BERGOGNE-BEREZIN, 1999),	19
TABLEAU IV : CMI DE LA SPIRAMYCINE POUR DES SOUCHES BACTERIENNES D'ORIGINE BOVINE (LAVAL, 1990), 20	20
TABLEAU V : INDICATIONS DE LA SPIRAMYCINE EN MEDECINE VETERINAIRE (ANONYME, 2005),	22
TABLEAU VI : PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES (MOYENNE \pm ECART-TYPE) DE LA SPIRAMYCINE APRES ADMINISTRATION A LA DOSE DE 30 000 UI/KG CHEZ DES VACHES LAITIERES SAINES (SANDERS <i>ET AL.</i> , 1992).	24
TABLEAU VII : VARIATION DES CMI DE SPIRAMYCINE POUR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC65638P EN FONCTION DU PH (MERIAL),	26
TABLEAU VIII : CONCENTRATIONS DE SPIRAMYCINE (EN MG/L) DANS LE LAIT ET LES SECRETIONS DE LA MAMELLE TARIE APRES TRAITEMENT HORS LACTATION PAR VOIE SYSTEMIQUE (ZIV, 1991),.....	28
TABLEAU IX : COMPARAISON DES CMI DE SPIRAMYCINE POUR <i>S.AUREUS</i> ET DES STREPTOCOQUES D'ORIGINE BOVINE ET DE LA CONCENTRATION MAMMAIRE DE SPIRAMYCINE (MERIAL ⁵),	29
TABLEAU X : PRINCIPAUX PHENOTYPES DE RESISTANCE AUX MACROLIDES, LINCOSAMIDES ET STREPTOGRAMINES CHEZ LES STAPHYLOCOQUES (BISMUTH ET LECLERCQ, 2000),.....	34
TABLEAU XI : GENOTYPES ET PHENOTYPES DE RESISTANCE AUX MACROLIDES ET ANTIBIOTIQUES APPARENTES CHEZ LES STREPTOCOQUES (CANU ET LECLERCQ, 2002),	37
TABLEAU XII : FREQUENCES DE RESISTANCE (EN %) AUX MACROLIDES ET APPARENTES DE SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES DE SECRETIONS MAMMAIRES CHEZ LA VACHE,	39
TABLEAU XIII : ORIGINE GEOGRAPHIQUE DES SOUCHES CLINIQUES TESTEES,	47
TABLEAU XIV : CARACTERISTIQUES DES SOUCHES DE « <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> » IDENTIFIEES PAR SEQUENÇAGE DU GENE CODANT POUR L'ARN16S,	49
TABLEAU XV : CONCENTRATION ET PURETE EN ADN DES HUIT SOUCHES TESTEES,	50
TABLEAU XVI : CARACTERISTIQUES DES AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION DU GENE CODANT POUR L'ARN 16S,.....	51
TABLEAU XVII : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL POUR LA PCR,	51
TABLEAU XVIII : PROGRAMME D'AMPLIFICATION,	52
TABLEAU XIX : ORIGINE ET PREPARATION DES ANTIBIOTIQUES,	54
TABLEAU XX : RESULTATS DU CONTROLE DE QUALITE POUR LA MESURE DES CMI,.....	57
TABLEAU XXI : RESULTATS DU CONTROLE DE QUALITE POUR LA MESURE DES CMI,	58
TABLEAU XXII : CONCENTRATIONS CRITIQUES (EN MG/L) UTILISEES POUR LA CATEGORISATION CLINIQUE,	59
TABLEAU XXIII : DISQUES UTILISES (CHARGES ET ORIGINE) POUR LA TECHNIQUE DES DISQUES,	60
TABLEAU XXIV : RESULTATS DU CONTROLE DE QUALITE POUR LES ANTILOGRAMMES PAR LA TECHNIQUE DES DISQUES,.....	62
TABLEAU XXV : DIAMETRES CRITIQUES (EN MM) UTILISES POUR LA CATEGORISATION CLINIQUE,.....	63
TABLEAU XXVI : CARACTERISTIQUES DES NEUF SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> UTILISEES,	66
TABLEAU XXVII : PROFILS DE RESISTANCE AUX MACROLIDES ET APPARENTES POUR 47 SOUCHES SAUVAGES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES DE MAMMITES CLINIQUES CHEZ LA VACHE,.....	70
TABLEAU XXVIII : ANTILOGRAMMES PAR LA TECHNIQUE DES DISQUES POUR 47 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> : VALEURS DES DIAMETRES POUR LES SOUCHES SENSIBLES,.....	73
TABLEAU XXIX : ANTILOGRAMMES PAR LA TECHNIQUE DES DISQUES POUR 43 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> : VALEURS DES DIAMETRES POUR LES SOUCHES SENSIBLES,.....	78
TABLEAU XXX : PROFILS DE RESISTANCE AUX MACROLIDES ET APPARENTES DE 43 SOUCHES SAUVAGES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> ISOLEES DE MAMMITES CLINIQUES CHEZ LA VACHE,	79
TABLEAU XXXI : CATEGORISATION CLINIQUE DE SOUCHES DE <i>S. AUREUS</i> POUR LA SPIRAMYCINE A PARTIR DE L'ANTILOGRAMME PAR DIFFUSION REALISE SUR L'ERYTHROMYCINE ET LA LINCOSAMYCINE,.....	88

FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA SPIRAMYCINE (BRISSON-NOËL <i>ET AL.</i> , 1988)	14
FIGURE 2 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE SPIRAMYCINE CHEZ UNE VACHE APRES ADMINISTRATION D'UNE UNIQUE DOSE DE 30 000 UI/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE (◊), INTRAMUSCULAIRE (Δ) OU SOUS-CUTANEE () (SANDERS <i>ET AL.</i> , 1992).	24
FIGURE 3 : CONCENTRATIONS MOYENNES DE SPIRAMYCINE DANS LE LAIT CHEZ UNE VACHE APRES ADMINISTRATION D'UNE UNIQUE DOSE DE 30 000 UI/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE (◊), INTRAMUSCULAIRE (Δ) OU SOUS-CUTANEE () (SANDERS <i>ET AL.</i> , 1992).	27
FIGURE 4 : CONCENTRATION DE SPIRAMYCINE (EN MG/L) DANS LES SECRETIONS MAMMAIRES APRES UN TRAITEMENT AU TARISSEMENT AVEC 300 MG D'ADIPATE DE SPIRAMYCINE EN POMMADE INTRAMAMMAIRE ADMINISTRE A 16 VACHES (ZIV, 1980A).	28
FIGURE 5 : SCHEMA DE LA DISPOSITION DES DISQUES POUR L'EVALUATION DE LA SENSIBILITE DES STREPTOCOQUES AUX MACROLIDES ET APPARENTES PAR LA TECHNIQUE DE DIFFUSION.	61
FIGURE 7 : PHENOTYPE MLS_B INDUCTIBLE CHEZ UNE SOUCHE DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	63
FIGURE 8 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI D'ERYTHROMYCINE POUR 47 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	68
FIGURE 9 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI DE LINCOMYCINE POUR 47 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	68
FIGURE 10 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI DE JOSAMYCINE POUR 47 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	69
FIGURE 11 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI DE PRISTINAMYCINE POUR 47 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	69
FIGURE 12 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI DE LA SPIRAMYCINE POUR 47 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	71
FIGURE 13 : HISTOGRAMMES DE LA DISTRIBUTION DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION (EN MM) POUR 47 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ET QUATRE MACROLIDES ET APPARENTES.	72
FIGURE 14 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI D'ERYTHROMYCINE POUR 43 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	74
FIGURE 15 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI DE SPIRAMYCINE POUR 43 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	74
FIGURE 16 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI DE JOSAMYCINE POUR 43 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	75
FIGURE 17 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI DE LINCOMYCINE POUR 43 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	76
FIGURE 18 : HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES CMI DE PRISTINAMYCINE POUR 43 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	76
FIGURE 19 : HISTOGRAMMES DE LA DISTRIBUTION DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION (EN MM) POUR 43 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	77
FIGURE 20 : DISTRIBUTION DES CMI D'AZITHROMYCINE (EN MG/L) POUR 31 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> ISSUES DE LAITS DE MAMMITES CLINIQUES CHEZ LA VACHE.	80
FIGURE 21 : DISTRIBUTION DES CMI D'AZITHROMYCINE (EN MG/L) POUR 31 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> ISSUES DE LAITS DE MAMMITES CLINIQUES CHEZ LA VACHE.	80
FIGURE 21 : SEQUENCES OBTENUES APRES PCR POUR SIX SOUCHES SAUVAGES DE <i>S. UBERIS</i> / <i>S. PARAUBERIS</i> ET LES DEUX SOUCHES-TYPES.	82
FIGURE 22 : TEST DE SATELLITISME DE GOTS SUR SIX SOUCHES DE <i>S. UBERIS</i> : DEUX TEMOINS NEGATIFS AVEC UNE SOUCHE SAUVAGE (N°55) ET UNE SOUCHE DE PHENOTYPE MLS_B (N°63) ; QUATRE SOUCHES DE RESISTANCE DE BAS NIVEAU (N°70, N°76, N°77 ET N°85).	84
FIGURE 23 : DISTRIBUTION DES CMI DE CLINDAMYCINE (EN MG/L) POUR 19 SOUCHES DE <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> ISSUES DE LAITS DE MAMMITES CLINIQUES CHEZ LA VACHE.	85

ANNEXES

ANNEXE 1 : PREPARATIONS A BASE D'EMBOATE DE SPIRAMYCINE COMMERCIALISEES EN MEDECINE VETERINAIRE (ANONYME, 2005).....	93
ANNEXE 2 : PREPARATIONS A BASE D'ADIPATE DE SPIRAMYCINE COMMERCIALISEES EN MEDECINE VETERINAIRE (ANONYME, 2005).....	94
ANNEXE 3 : PREPARATIONS A BASE DE SPIRAMYCINE BASE COMMERCIALISEES EN MEDECINE VETERINAIRE (ANONYME, 2005).....	95

Dans son acception la plus générale, le terme de mammite désigne l'inflammation de la glande mammaire, que la cause soit traumatique ou infectieuse. Dans tous les cas, il y a une augmentation du nombre de cellules dans le lait qui est due essentiellement au passage dans les cavités mammaires de leucocytes polynucléaires neutrophiles venant de la circulation sanguine. Les mammites sont la « maladie professionnelle » de la vache laitière : elles représentent la pathologie dominante chez la vache laitière devant les troubles de la reproduction et les boiteries. Tous types confondus, les mammites sont présentes dans plus de 50 % des cheptels laitiers et 25 % des quartiers souffrent de mammites cliniques en France. Les mammites ont des conséquences économiques considérables pour l'éleveur laitier : le paiement du lait est fonction de sa teneur en protides et lipides et de son comptage cellulaire, un lait riche en « cellules » sera moins bien payé. Tout comme l'éleveur, l'industrie laitière est touchée car le lait est généralement impropre à la consommation et à la transformation.

Les mammites ont des manifestations très variées. Lors de mammite clinique, la vache présente des symptômes cliniques locaux voire généraux qui avec la modification macroscopique du lait suffisent au diagnostic. Cependant, dans 95 % des cas, les mammites restent subcliniques et sont diagnostiquées uniquement par une analyse du lait qui présente un nombre élevé de cellules somatiques.

Sur le plan épidémiologique, les mammites dites « de traite » sont dues à un manque d'hygiène lors de la traite alors que les mammites dites « d'environnement » sont liées à la contamination du canal du trayon entre deux traites, par des germes provenant de la litière.

Les mammites d'origine infectieuse sont de loin les plus fréquentes. Les infections mammaires sont presque toujours dues à des bactéries, et une unique espèce bactérienne est la plupart du temps responsable de la contamination d'un quartier. La persistance de cet agent dans le quartier colonisé, sa multiplication, les possibilités d'interactions avec les moyens de défense de la glande sont très variées et dressent des tableaux physiopathologiques multiples.

Les espèces le plus souvent isolées de laits de mammites sont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et différentes espèces de streptocoques dont *Streptococcus uberis*¹ et *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*² (Fabre *et al.*, 1991 ; Fabre *et al.*, 1997a ; Fabre *et al.*, 1997b). *Streptococcus agalactiae* n'est plus isolé qu'exceptionnellement alors

¹ La distinction phénotypique entre *Streptococcus uberis* et *Streptococcus parauberis* n'est pas possible et nous les désignerons globalement par « *Streptococcus uberis* ».

² Dans notre étude, la mention *Streptococcus dysgalactiae* désigne *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

que des staphylocoques à coagulase négative sont maintenant considérés comme des « pathogènes majeurs » (Myllys *et al.*, 1994). *S. aureus* est une bactérie présente à la surface de la peau, et en particulier à l'extrémité des trayons. elle est résistante aux agents physico-chimiques, transmissible et équipée d'un appareillage enzymatique complexe ; *S. aureus* est et reste un germe majeur de mammite. Elle provoque des mammites dites de « traite », cliniques ou subcliniques. Ce serait la première cause de mammites subcliniques chez la vache (Fabre *et al.*, 1997b). *S. uberis* est considéré comme responsable, avec *Escherichia coli*, de la majeure partie des mammites cliniques (Bramley, 1984 ; Fabre *et al.*, 1997a). Les mammites cliniques à *S. uberis* sont fréquentes en début de lactation et cette bactérie est responsable de la plupart des infections acquises pendant le tarissement. Ces infections semblent donc associées aux conditions modernes de la production laitière, à la régression des infections par les autres germes à Gram positif, à leur caractère ubiquiste et à un manque de prévention des infections d'origine environnementale.

Le traitement d'une mammite clinique repose sur une antibiothérapie adaptée et l'injection d'une pommade intramammaire directement dans le quartier par le canal du trayon. Des antibiotiques sont aussi administrés éventuellement par voie générale, en cas de symptômes généraux prononcés (hyperthermie, diarrhée, arumination, déshydratation). La prophylaxie médicale de cette maladie est systématique par application de pommades intramammaires dans les quatre quartiers au tarissement. Le traitement antibiotique doit respecter une précocité, une certaine durée et surtout l'utilisation au maximum de deux anti-infectieux en association. Le choix de l'antibiotique est en relation avec l'étiologie, mais souvent l'agent causal est plus suspecté que démontré. C'est ici que le prélèvement de lait en vue d'une analyse bactériologique trouve tout son intérêt. L'identification du germe pathogène est effectuée et, dans certains cas, par exemple lors d'échec du traitement de première intention, un antibiogramme est réalisé.

Des macrolides, notamment la spiramycine, sont disponibles pour les traitements en lactation et au tarissement des mammites dues à des coques à Gram positif. Il importe donc d'évaluer leur activité lors de la réalisation d'un antibiogramme, des résistances acquises ayant été rapportées par le RESAPATH, le REseau de Surveillance de l'Antibiorésistance pour les PATHogènes animaux de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Actuellement, de nombreuses souches de staphylocoques et de streptocoques, isolées de mammites cliniques chez la vache, sont catégorisées « intermédiaires » lors de l'évaluation de leur antibiosensibilité vis-à-vis de la spiramycine par la technique de diffusion

dite des disques. Les cliniciens ont alors tendance à recourir à des molécules plus récentes à large spectre, en particulier à des céphalosporines, pour un traitement de première intention

Dans ce contexte, notre étude avait pour objectif de réévaluer l'activité de la spiramycine sur des souches de coques isolées de laits de vache, en se basant notamment sur la mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par la technique de référence de dilution en milieu gélosé.

**EVALUATION DE
L'ACTIVITE DE LA
SPIRAMYCINE SUR DES
COQUES A GRAM POSITIF
ISOLES LORS D'INFECTIONS
MAMMAIRES CHEZ LA
VACHE**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Après la découverte de la pénicilline G, l'émergence de souches de *S. aureus* productrices de pénicillinases a stimulé les recherches chimiques ou de screening afin de trouver un ou des antibiotiques permettant de pallier cette résistance. Ainsi, de nouvelles entités chimiques ont été obtenues par fermentation de *Streptomyces* d'origine tellurique. Les macrolides ont été découverts dans ces circonstances. L'érythromycine a été isolée par Mac Guire en 1952. Obtenue par fermentation de *Saccharopolyspora erythraea*, elle était active contre les souches de *S. aureus* productrices de pénicillases ce qui lui valut une commercialisation rapide aux Etats-Unis. Sa structure a été élucidée en 1957. Des centaines de molécules ont été progressivement obtenues par fermentation de divers *Streptomyces* sp., *Micromonospora* sp. ou d'autres bactéries d'origine tellurique ou par hémisynthèse. Les macrolides regroupent de nombreuses molécules qui diffèrent par leur structure chimique, mais qui possèdent en commun un noyau lactonique constitué de 12 à 16 chaînons, un ou deux sucres aminés et/ou neutres et pas d'azote endocyclique (Bryskier et Bergogne-Bérézin, 1999). Les macrolides importants en thérapeutique humaine ou vétérinaire possèdent 14, 15 ou 16 chaînons.

Les macrolides à 14 chaînons se différencient en deux groupes : ceux d'origine naturelle, comme l'érythromycine A ou l'oléandomycine et ceux obtenus par hémisynthèse à partir de l'érythromycine A, avec la roxithromycine, la clarithromycine et la dirithromycine. Les kétolides se caractérisent par l'absence du sucre neutre (α -L-cladinose). Les azalides à 15 atomes de carbone (azithromycine, tulathromycine) possèdent un atome d'azote endocyclique. Les macrolides à 16 chaînons se divisent en deux groupes : les molécules naturelles comme la josamycine, la spiramycine et la midécamycine et les molécules obtenues par hémisynthèse comme la miocamycine, la rokitamycine et la tilmicosine (Vincent et Visent, 1996 ; Bryskier, 1997)

En médecine vétérinaire, trois macrolides d'origine naturelle : l'érythromycine, la spiramycine et la tylosine, sont employés depuis de nombreuses années. La tulathromycine et la tilmicosine sont apparues récemment sur le marché. L'utilisation de la josamycine est accessoire.

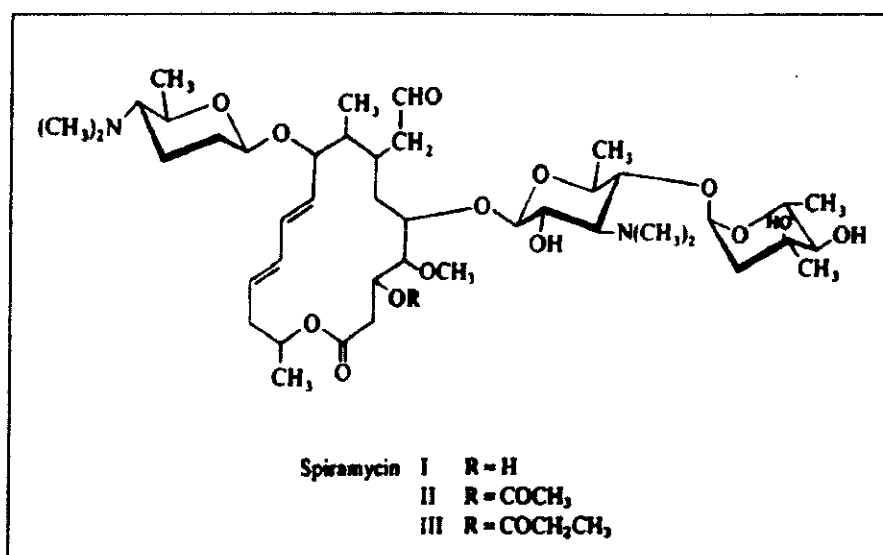
Initialement destinée à la médecine humaine, la spiramycine a également été développée en médecine vétérinaire. Chez l'homme, elle avait suscité un regain d'intérêt dans les années 80-90 avec l'évolution de la pathologie, du fait par exemple de son activité sur l'agent de la légionellose, sur les souches de *Streptococcus pneumoniae* résistantes à la benzylpénicilline et de son intérêt dans le traitement de la toxoplasmose congénitale (Laval, 1990).

I. Pharmacie chimique de la spiramycine

A. Structure

La spiramycine (Figure 1) est un complexe formé de trois composants majeurs (I à III) qui se différencient par le substituant en position 3 du noyau lactonique : 3-OH (spiramycine I), 3-O-acétyl (spiramycine II) et 3-O-propionyl (spiramycine III). Autrement dit, les spiramycines II et III dérivent respectivement d'une acétylation et d'une propionylation de la spiramycine I (Tableau I). La spiramycine est le seul macrolide possédant un noyau à 16 atomes de carbone qui contiennent deux sucres diméthylamino substitués ce qui pourrait rendre compte de l'absence de toxicité hépatique.

Figure 1 : Structure chimique de la spiramycine (Brisson-Noël *et al.*, 1988).



La spiramycine I est la forme principale. Les autres composants ne doivent représenter qu'au maximum 15 % de la spiramycine totale selon les recommandations de la pharmacopée européenne.

La composition de la matière première est la suivante (par rapport à la substance desséchée) :

- spiramycine I > 80 %,
- spiramycine II < 5%,
- spiramycine III < 10%,
- spiramycine I + spiramycine II + spiramycine III > 90 %.

Tableau I : Caractéristiques des différents composés de la spiramycine (Sanders, 1992).

Forme de la spiramycine	Formule brute	Poids moléculaire en Daltons
I	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	843.07
II	$C_{45}H_{76}N_2O_{15}$	885.11
III	$C_{46}H_{78}N_2O_{15}$	899.14

Les propriétés physique, chimique et biologique de la spiramycine I, II et III sont très voisines.

B. Origine

La spiramycine a été isolée par Pinnert-Sindico en 1955 à partir de bouillons de culture de *Streptomyces ambofaciens*. Le processus de fabrication est caractérisé par une faible productivité. Les antibiotiques obtenus sont composés de mélanges de substances apparentées en proportions variables, et qui ne possèdent pas toujours les mêmes activités microbiologiques.

C. Propriétés physiques et chimiques

1) Propriétés physiques (Sanders, 1992)

La matière active pure est une poudre blanche ou légèrement jaunâtre, d'odeur faible, de goût très amer qui à l'état sec se conserve pendant 3 ans, faiblement hygroscopique, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool, dans le méthanol et dans l'acétone, assez soluble dans l'éther. Sa solubilité est meilleure à + 4 °C. En solution aqueuse, sa stabilité est de 58 heures à + 5 °C. Son absorption dans l'UV est maximale à 231 nm en solution dans l'éthane.

2) Propriétés chimiques

a) Stabilité

Les spiramycines sont beaucoup plus stables que l'érythromycine A en milieu acide. Ainsi, la spiramycine n'est pas détruite par l'acidité stomacale. La présence de groupements basiques dans sa structure protège de l'hydrolyse les liaisons osidiques ; ils exercent un effet

répulsif à l'encontre des molécules d'eau environnantes. Cependant, dans des conditions très acides, il se produit une rupture du L-mycarose ; les néospiramycines, qui sont des dérivés desmycarosyles, sont plus actifs *in vitro* que la molécule mère mais sont inactifs *in vivo* (Bryskier et Bergogne-Bérézin, 1999)

b) Caractère basique

La spiramycine possède des fonctions basiques, notamment des fonctions amines tertiaires (groupe diméthylamine) qui lui confère un caractère de base faible avec un pKa de 7,7 pour la spiramycine I.

c) Préparation de sels

Ces diverses fonctions basiques permettent la préparation d'une grande diversité de sels d'acides minéraux et organiques (Tableau II).

Tableau II: Les différentes formes de la spiramycine en santé animale (Schumacher, 1992).

Formes de spiramycine	Principales caractéristiques	Formes galéniques	Voies d'administration
Spiramycine base	liposolubilité excipient favorisant une hydrosolubilité et la stabilité de la spiramycine : le monométhylacétamide*	comprimés solutions injectables prêtes à l'emploi	orale intramusculaire
Adipate de spiramycine	hydrosoluble	solutions injectables = préparations extemporanées poudres solubles pour traitement par l'eau de boisson seringues intramammaires	intramusculaire, sous cutanée orale intramammaire
Embonate de spiramycine	très peu hydrosoluble absence de saveur et inodore, absence de propriétés électrostatiques, stabilité à haute température, peu sensible à l'acidité gastrique	utilisation dans les aliments médicamenteux = prémélange	orale

*Le monométhylacétamide possède un rôle de conservateur mais il rend aussi la solution plus hydrosoluble, la spiramycine base étant caractérisée par sa forte liposolubilité.

II. Mode d'action de la spiramycine (Brisson-Noël *et al.*, 1988 ; Mazzei *et al.*, 1993)

Les macrolides agissent en inhibant la synthèse des protéines bactériennes. Malgré de nombreuses études depuis les années 60, le mécanisme d'action de la spiramycine et des autres macrolides est controversé et mal élucidé.

Les ribosomes sont les cibles intracellulaires. Ils sont formés d'une petite sous-unité 30S et d'une grosse sous-unité 50S. Cette dernière est composée d'ARN 23S et 5S et d'au moins 30 protéines désignées par la lettre L (« Large »). La structure secondaire de l'ARN 23S est repliée du fait de l'appariement des bases complémentaires et forme 6 domaines numérotés de I à VI. Des contacts complexes entre l'ARN et les protéines assurent l'organisation tridimensionnelle de la molécule (structure tertiaire). La stabilité de l'ensemble est favorisée par les interactions avec différentes protéines dont L22 et L4. La sous-unité 50S comporte deux sites particuliers :

- le site A est le site accepteur d'acides aminés où se lient les aminoacyl-ARNt,
- le site P est le site donneur peptidyl où se trouve la chaîne peptidique en cours d'élongation.

Il a été récemment démontré que les macrolides se fixent de façon réversible à l'ARN 23S au niveau des domaines II et V (boucle peptidyltransférase) (Retsema et Fu, 2001). La spiramycine se lie aux sous-unités 50S des ribosomes avec un rapport stoechiométrique de 1:1. La fixation de la spiramycine aux ribosomes est réversible et très durable. Cet antibiotique rentre en compétition avec les autres macrolides pour cette liaison. Cette compétition mutuelle suggère que les macrolides se lient à des sites identiques ou très proches sur le ribosome. L'érythromycine interagirait aussi avec les protéines L15, L16 et L22 et la spiramycine avec la protéine L27.

Les macrolides bloquent la synthèse des protéines à l'étape d'élongation en inhibant la peptidyl-transférase. Si cela a été bien établi pour la spiramycine, d'autres mécanismes d'action moléculaires ont été proposés pour l'érythromycine qui inhiberait la translocation et provoquerait la libération de chaînes peptidiques incomplètes.

Les macrolides - au moins les anciens - ont une activité antibactérienne considérée comme bactériostatique. De nombreuses études ont montré que l'accumulation intrabactérienne n'est pas bloquée par des inhibiteurs métaboliques et qu'ils pénètrent à l'intérieur de la bactérie par diffusion passive. Les antibiotiques hydrophobes ne peuvent pas franchir la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif. Ceci explique la résistance naturelle des entérobactéries, en particulier. De plus, les macrolides étant des substances basiques ionisables, leur pénétration est influencée par le pH du milieu : ils sont plus actifs à pH basique (égal à 8), où ils sont le moins ionisés, qu'à pH acide.

III. Spectre d'activité et utilisation thérapeutique de la spiramycine

A. Spectre d'action

Le spectre antibactérien naturel des macrolides recouvre les bacilles et coques à Gram positif, les cocci à Gram négatif, les bactéries à Gram positif anaérobies strictes, certains bacilles à Gram négatif, comme *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, des *Pasteurellaceae*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Legionella*, et les mycoplasmes.

Les macrolides non liés aux protéines plasmatiques et non ionisés diffusent à travers les membranes cellulaires et se concentrent passivement dans de nombreuses cellules comme les polynucléaires et les monocytes - macrophages ; ces antibiotiques ont ainsi une bonne activité vis-à-vis de bactéries intracellulaires strictes en particulier les chlamydophilies.

Certains parasites sont également sensibles aux macrolides tels *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium* sp. (Bryskier et Bergogne-Bérézin, 1999).

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de spiramycine pour des souches bactériennes d'origine humaine sont rapportées dans le tableau III (Bryskier et Bergogne-Bérézin, 1999).

Tableau III : Activité *in vitro* de la spiramycine (Bryskier et Bergogne-Bérézin, 1999).

	CMI ₅₀ (mg/L) de la spiramycine
<i>Staphylococcus aureus</i> méti S	1,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,12
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,03
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,12
Streptocoques du groupe <i>viridans</i>	0,03
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,0
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2,0
<i>Haemophilus influenzae</i>	8,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,5
<i>Legionella pneumophila</i>	16,0
<i>Bordetella pertussis</i>	0,12

En ce qui concerne les souches animales, la spiramycine inclut dans son spectre d'action (Tableau IV) les staphylocoques, les streptocoques, les clostridies et les mycoplasmes. Selon Gaillot (cours de bactériologie de l'Institut Pasteur de Paris, 2004), la sensibilité de *Pasteurella multocida* et de *Mannheimia haemolytica* à certains macrolides (érythromycine, spiramycine, josamycine, tylosine) et aux kétolides est modérée, voire médiocre. Néanmoins, cette notion va à l'encontre de l'expérience des cliniciens vétérinaires qui l'utilisent depuis longtemps avec succès dans les traitements des infections animales dues à ces bactéries (Schumacher, 1992).

Tableau IV : CMI de la spiramycine pour des souches bactériennes d'origine bovine (Laval, 1990).

Bactéries	Etendue des CMI (en mg/L)
<i>Mycoplasma bovis</i>	0,5 à 15,3
<i>Pasteurella multocida</i>	1 à 15,3
<i>Mannheimia haemolytica</i>	2 à 15,3
<i>Streptococcus</i> sp.	0,24 à 0,28
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,06 à 3,77

Ce spectre d'activité recoupe de nombreuses affections bactériennes rencontrées en médecine vétérinaire, en particulier bronchopneumonies, mammites autres que colibacillaires, mais aussi arthrites, métrites, omphalites...

B. Utilisation thérapeutique de la spiramycine

La spiramycine présente de nombreuses indications chez la plupart des espèces domestiques en pathologie respiratoire, dans le traitement des mammites chez la vache, dans les staphylococcies et mycoplasmoses chez les porcins et les volailles, chez les lapins et les carnivores (Tableau V). Elle est aussi incorporée dans des aliments médicamenteux destinés aux porcs, aux veaux, aux lapins et aux volailles (Annexe 1). Très peu toxique, elle peut être administrée par voie orale, par voie parentérale, dans l'eau ou l'aliment (Laval, 1992).

La spiramycine est présente à ce jour dans 22 spécialités vétérinaires en France sous forme de solutions, de suspensions ou de poudres injectables, sous forme de poudres orales, de comprimés, de pommades intramammaires ou de pâtes orales (Annexes 2 et 3).

En médecine vétérinaire, elle est surtout utilisée dans le traitement des staphylococcies, des mycoplasmoses et des pasteurelloses au sens large.

Des essais cliniques ont confirmé l'intérêt de la spiramycine pour le traitement des mammites à *Staphylococcus aureus* et à streptocoques (Laval, 1992). La spiramycine est utilisée à la posologie de 32 000 UI/kg par voie intramusculaire, renouvelée une fois éventuellement, chez les bovins. Elle est aussi utilisée pour le traitement au tarissement (1 200 000 UI/quartier) en association avec la néomycine. L'association d'un traitement à base de spiramycine par voie générale à une administration antibiotique par voie

intramammaire permet d'obtenir de meilleurs résultats lors des traitements hors lactation sur des vaches infectées chroniques (Pravieux *et al.*, 2001). Ainsi, la combinaison des deux traitements (voie intramusculaire et voie intramammaire) a permis de passer d'un taux de guérison de 30 % à 62 % (Ziv, 1991)

La confrontation des concentrations sériques de la spiramycine et des CMI pour *Pasteurella multocida* et *Mannheimia haemolytica* ne permettait pas d'envisager une activité sur ces germes. Cependant, par sa pharmacodynamie, en particulier sa concentration dans le poumon et les sécrétions bronchiques, la spiramycine est efficace dans le traitement et la métaphylaxie des bronchopneumonies infectieuses bovines (Alzieu *et al.*, 1988). La posologie utilisée en pathologie pulmonaire est de 100 000 UI/kg par voie intramusculaire. Cette posologie est particulièrement intéressante d'autant plus que, renouvelée à 48 h, elle permet de maintenir des concentrations actives dans les différents compartiments pulmonaires (poumons, sécrétions bronchiques, amygdales et sinus) jusqu'à 7 à 10 jours après le début du traitement. Elle a fait la preuve de son efficacité tant lors d'études expérimentales (Gau, 1990 ; Schumacher, 1992) que lors d'enquêtes sur le terrain (Alzieu *et al.*, 1988).

La spiramycine peut être utilisée en association avec d'autres anti-infectieux. L'association spiramycine-métronidazole est utilisée dans le traitement par voie orale des affections bucco-dentaires du chien : le traitement guérit les stomatites et gingivites, fait disparaître la mauvaise haleine en exerçant une action inhibitrice sur l'association fusiformes-spirochètes qui constituent la flore buccale potentiellement pathogène (Brook, 1988). L'efficacité de cette association a été démontré dans le traitement des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin et des Proliférations Bactériennes Chroniques de l'Intestin avec une utilisation sur des périodes prolongées (Lecoindre *et al.*, 1998). L'association de spiramycine et de triméthoprime est commercialisée en médecine vétérinaire avec pour indication les infections respiratoires chez les animaux de production (porcelets, lapins, volailles et veaux) : le spectre d'activité est dirigée à la fois contre les bactéries à Gram positif (staphylocoques et streptocoques) et les germes à Gram négatif (colibacilles, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Bordetella*).

Tableau V : Indications de la spiramycine en médecine vétérinaire (Anonyme, 2005).

Indications	Animaux de production					Animaux de compagnie
	Bovins	Ovins-Caprins	Porcs	Volailles	Lapins	
Respiratoires	Traitement et métaphylaxie des BPIE	Pneumopathies	Pneumopathies Toux de porcherie Rhinite atrophique	Maladie respiratoire chronique (MRC) Sinusite infectieuse du dindon	Pneumopathies Coryza infectieux	Carnivores
Digestives			Gastro-entérites infectieuses			MICI ³ PBCI ⁴
Mammaires	Traitement et prévention des mammites	Traitement et prévention des mammites	Traitement et prévention des mammites			
Articulaires	Arthrites Panaris interdigité	Arthrites Panaris interdigité	Arthrites	Synovite infectieuse		
Autres	Métrites Omphalites, omphalophlébites Prévention et traitement des infections à germes sensibles à la spiramycine chez le veau	Métrites Omphalites, omphalophlébites	Streptococcies Rouget Prévention des infections néonatales du porcelet Prévention et traitement des germes sensibles à la spiramycine	Mycoplasmoses Prévention du stress vaccinal Prévention et traitement des germes sensibles à la spiramycine		Stomatites, gingivites, maladies parodontales

³ Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

⁴ Proliférations Bactériennes Chroniques de l'Intestin

IV. Propriétés pharmacocinétiques de la spiramycine

La pharmacocinétique a été étudiée chez l'homme et chez les principales espèces animales (Laval, 1990). Nous limiterons cette étude de la pharmacocinétique à des données générales et à celles particulières à la vache.

Le devenir dans l'organisme de la spiramycine est principalement conditionné par trois propriétés :

- sa lipophilie,
- une stabilité satisfaisante,
- son caractère basique.

Stable en milieu gastrique, la spiramycine peut être administrée par voie orale. Après ingestion, elle est rapidement absorbée par l'intestin (Laval, 1990). Sa biodisponibilité après injection par voie intramusculaire ou sous-cutanée est presque de 100 % (Sanders *et al.*, 1992).

D'après Ziv (1974), chez la vache, l'injection par voie intraveineuse d'une dose unique de 20 mg/kg de spiramycine permet d'obtenir un pic sérique de l'ordre de 20 mg/L, qui chute rapidement à 3 mg/L à la deuxième heure, et décroît ensuite lentement de façon à atteindre 0,8 mg/L à la 72^{ème} heure. Le pic sérique après injection par voie intramusculaire d'une dose unique de 20 mg/kg est obtenu à la troisième heure (3 mg/L) et la concentration est de 1 mg/L à la 12^{ème} heure.

Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés plus récemment chez des vaches laitières saines après administration par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée d'une dose unique de spiramycine (30 000 UI/kg soit 9,37 mg/kg) sous forme de Suanovil 20[®] ; les concentrations plasmatiques ont été évaluées par chromatographie liquide haute pression (Tableau VI ; Figure 2) (Sanders, 1992 ; Sanders *et al.*, 1992).

Tableau VI : Paramètres pharmacocinétiques (moyenne \pm écart-type) de la spiramycine après administration à la dose de 30 000 UI/kg chez des vaches laitières saines (Sanders *et al.*, 1992).

Paramètre	Voie		
	IV	IM	SC
T $\frac{1}{2}$ Ka (h)		0,53 \pm 0,34	1,95 \pm 3,04
T $\frac{1}{2}$ B (h)	8,59 \pm 1,58	9,81 \pm 2,40	8,79 \pm 3,06
Tmax (h)		3,33 \pm 2,30	8,04 \pm 3,38
Cmax (UI/mL)		1,44 \pm 0,25	1,01 \pm 0,35
AUC (UI.h/mL)	26,92 \pm 7,17	27,14 \pm 4,03	25,63 \pm 3,49
F %		104,81 \pm 20,62	58,55 \pm 18,66

AUC : aire sous la courbe

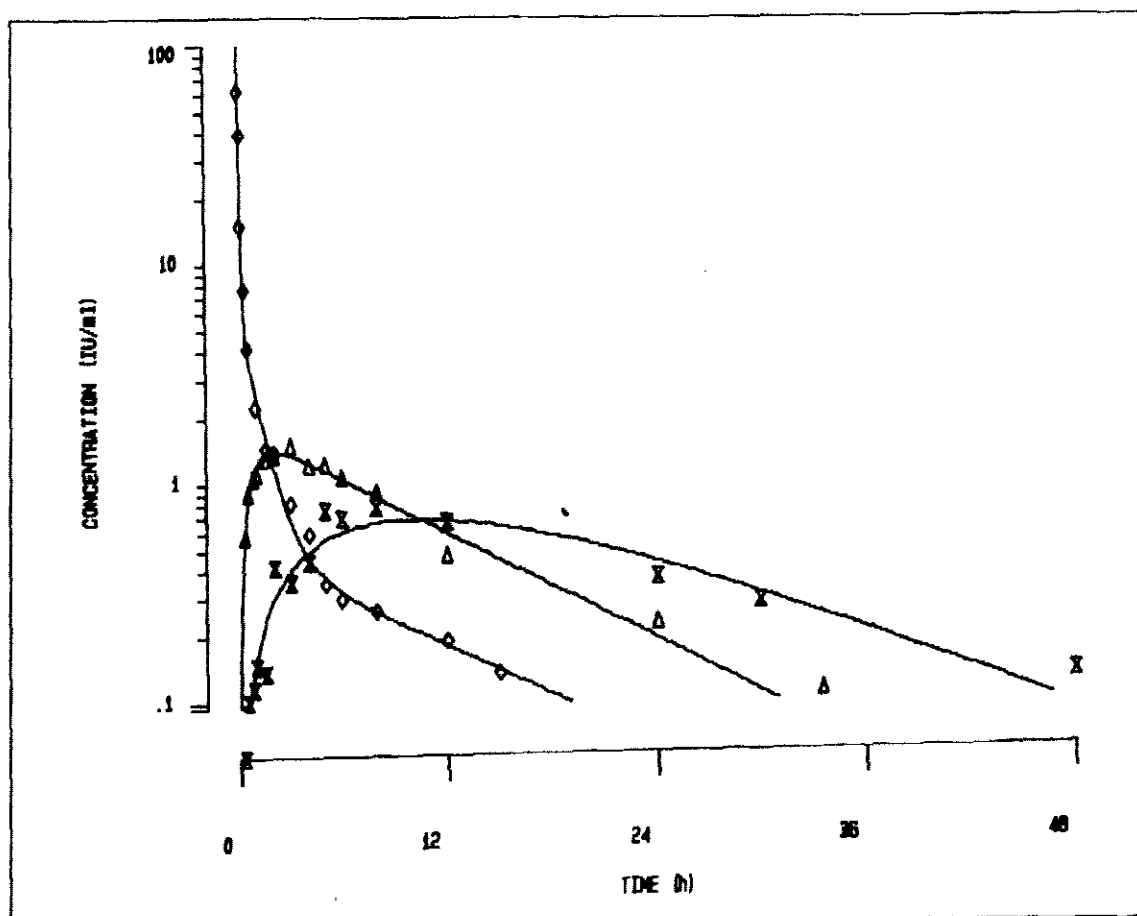
T $\frac{1}{2}$ Ka : temps de demi-vie d'absorption

T $\frac{1}{2}$ B : temps de demi-vie d'élimination

Tmax : temps calculé d'obtention de la concentration maximale Cmax

F : fraction absorbée

Figure 2 : Concentrations plasmatiques de spiramycine chez une vache après administration d'une unique dose de 30 000 UI/kg par voie intraveineuse (\diamond), intramusculaire (Δ) ou sous-cutanée (\times) (Sanders *et al.*, 1992).



Pour la voie intraveineuse, le temps de demi-vie final était de $8,73 \pm 0,2$ h et la clairance variait de $0,78$ L/kg/h à $1,92$ L/kg/h. Le volume de distribution à l'équilibre (V_{ss}) de $6,24 \pm 2,56$ L/kg était 23 fois plus important que le volume central ($0,228 \pm 0,085$ L/kg). Le temps moyen de résidence de la spiramycine dans l'organisme variait de $2,60$ h à $6,57$ h selon les animaux tandis que le temps moyen de résidence dans le compartiment central était de $0,195 \pm 0,046$ h.

Après une injection intramusculaire, la concentration maximale observée sur les données variaient de $1,05$ à $1,91$ UI/mL et apparaissait entre 2 et 8 h après injection. La pente terminale était de $0,066 \pm 0,014$ h⁻¹. Le temps moyen de résidence variait de $10,06$ à $21,19$ h. La fraction absorbée était proche de 105 % en moyenne. L'absorption était caractérisée par un temps de demi absorption de $0,48$ h.

Le pic de concentration plasmatique observé ($1,24 \pm 0,42$ UI/mL) était obtenu plus tardivement à la suite d'une injection sous-cutanée à la dose de $30\ 000$ UI/kg. Le temps moyen de résidence de la spiramycine était de $20,6 \pm 4,7$ h et le temps moyen d'absorption variait de $9,65$ à $22,8$ h. La fraction absorbée était proche de 100 %.

La spiramycine se distribue largement dans tout l'organisme. Elle se lie peu aux protéines plasmatiques. Les macrolides se concentrent dans le parenchyme broncho-pulmonaire, dans les organes génitaux, la bile et au niveau de la sphère oto-rhino laryngée. La concentration tissulaire de la spiramycine sous une forme biologiquement active est très importante. Sa liposolubilité et son faible degré d'ionisation lui confèrent, comme aux autres macrolides, la capacité de traverser les membranes biologiques et un haut pouvoir de diffusion (diffusion passive). La spiramycine diffère des autres macrolides par sa longue persistance dans les tissus, qui est attribuée à sa lente métabolisation (Bergogne-Bérézin, 1988). Le volume de distribution particulièrement important est certainement un des plus élevés de tous les antibiotiques disponibles en médecine vétérinaire. Cette propriété intéressante doit néanmoins inciter à la prudence dans son utilisation dans les sujets proches de l'abattage, car elle persiste dans les tissus bien après sa disparition du plasma sanguin. Pour cette raison, son usage est déconseillé chez la vache en lactation, sauf lors du traitement des mammites, qui constituent une indication majeure dans cette espèce.

Selon Ziv et Sulman (1974), la métabolisation est essentiellement hépatique. Les métabolites de la spiramycine ont une activité antibactérienne inférieure à celle de la molécule mère.

Le rapport maximal des concentrations obtenues dans le lait par rapport aux concentrations sériques est atteint 2 à 3 heures après le pic plasmatique et varie de 5,72 à 8 après administration par voie intramusculaire d'une dose de 20 mg/kg (Ziv et Sulman, 1974). Les ratios sont proches des rapports calculés suivant le principe de diffusion passive pH-pK, le pH du lait étant de l'ordre de 6,8 et celui du sang de 7,4. Lors de mammites, le pH du lait augmente et le passage de la spiramycine dans la mamelle est diminué. Cependant, les concentrations plus faibles en antibiotique sont contrebalancées par une efficacité accrue liée à une baisse des CMI lorsque le pH est plus élevé (Tableau VII).

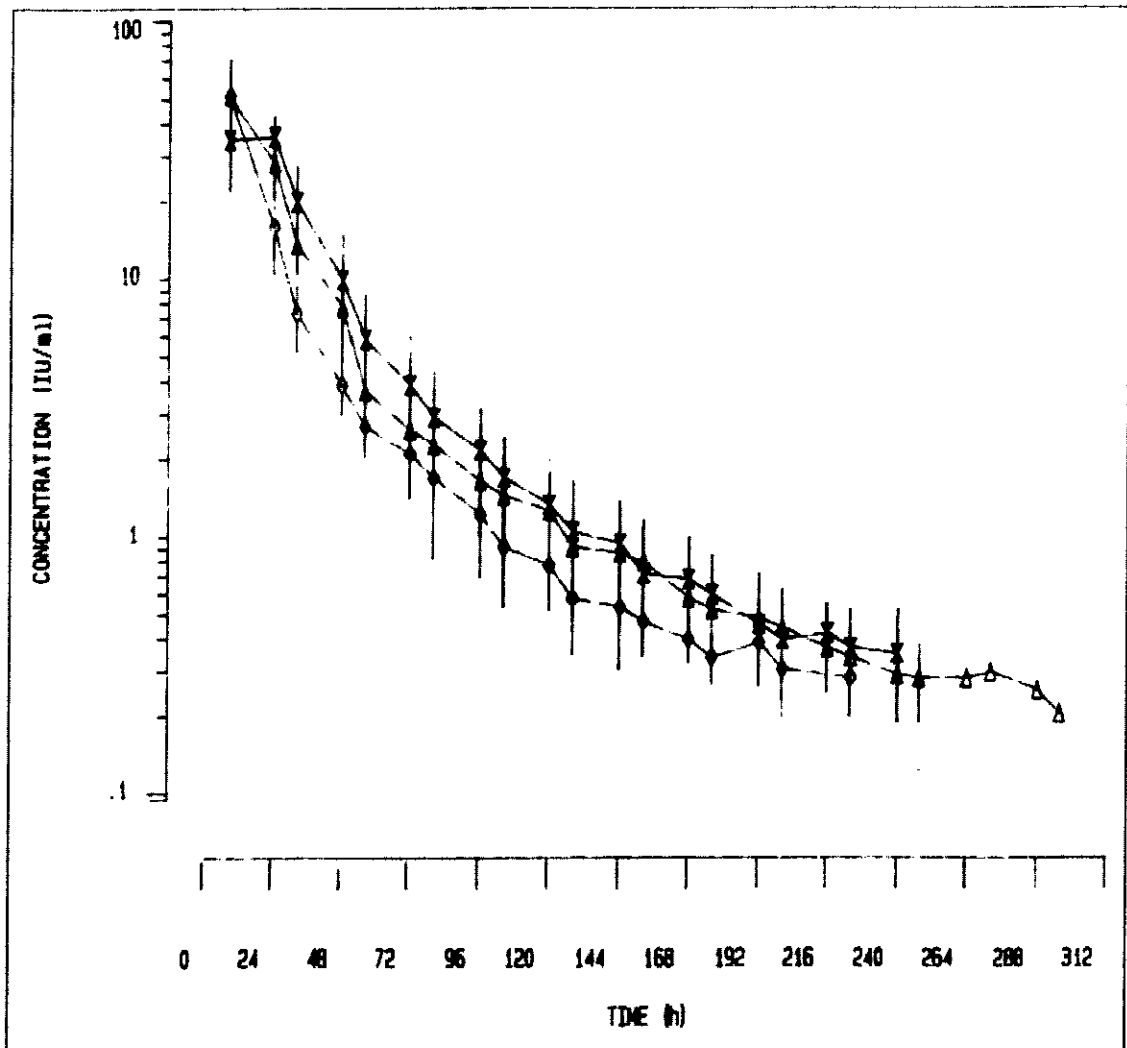
Tableau VII : Variation des CMI de spiramycine pour *Staphylococcus aureus* ATCC65638P en fonction du pH (Merial⁵).

pH du milieu	CMI de <i>S. aureus</i> (en mg/L)
7,2	15
7,6	7,5
8	3,75

D'après Sanders (1992), les quantités excrétées dans le lait après administration d'une dose de 30 000 UI/kg par voie intraveineuse varient de 2,34 à 6,66 %, de 0,5 % à 9,3 % après administration par la voie intramusculaire et de 2,05 à 8,98 % après administration par la voie sous-cutanée. La clairance de la spiramycine par la glande mammaire est de l'ordre de 0,05 L/kg/h quelle que soit la voie d'injection. Les voies intramusculaire et sous-cutanée sont bioéquivalentes en ce qui concerne les taux de spiramycine éliminés dans le lait. Le rapport des concentrations dans le lait par rapport au plasma est de 36,5 après l'administration intraveineuse, 49,5 après le traitement par la voie intramusculaire et 51,8 après l'injection sous-cutanée (Figure 3).

⁵ Vetomecum, Journal d'Information (Merial), n°252, Avril / Mai 2001

Figure 3 : Concentrations moyennes de spiramycine dans le lait chez une vache après administration d'une unique dose de 30 000 UI/kg par voie intraveineuse (\diamond), intramusculaire (Δ) ou sous-cutanée () (Sanders *et al.*, 1992).



Chez la vache atteinte de mammites, les concentrations de spiramycine dans le lait sont supérieures à 6 mg/L pendant au moins 24 heures, voire pendant plus de 48 heures après une seule injection par voie intramusculaire de 20 mg/kg (Laval, 1990).

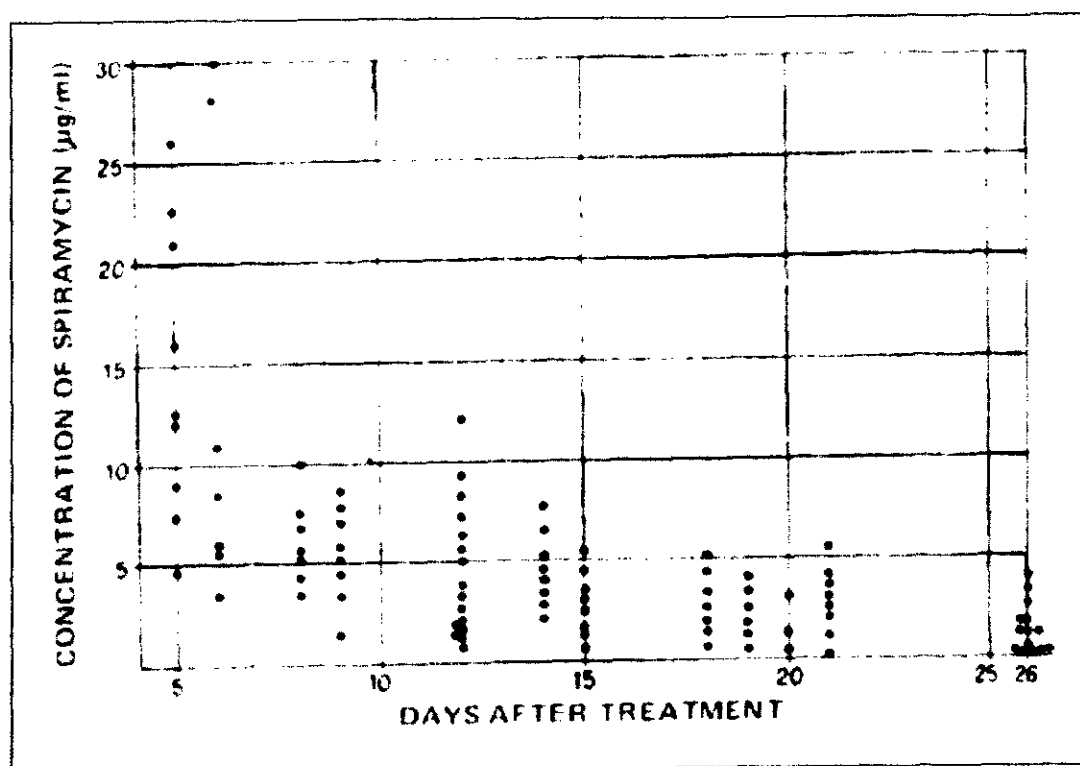
Les concentrations obtenues dans les sécrétions mammaires lors d'un traitement au tarissement par voie générale (Ziv, 1991) ou lors d'un traitement par voie diathélique (Ziv, 1980b) sont rapportées dans le tableau VIII et la figure 4.

Tableau VIII : Concentrations de spiramycine (en mg/L) dans le lait et les sécrétions de la mamelle tarie après traitement hors lactation par voie systémique (Ziv, 1991)

Temps après traitement		10 mg/kg IM n = 4	
heures	Jours	Moyenne	$\pm s_{n-1}$
2		0,30	0,11
4		1,51	0,90
6		2,07	1,35
8		4,79	3,70
10		5,36	3,08
24	1	4,85	2,67
	2	2,91	1,94
	3	1,61	1,17
	4	0,63	0,44
	5	0,41	0,15
	6	0,30	0,18
	8	0,08	0,09
	10	< 0,05	
	12	< 0,05	
	14	< 0,05	

Figure 4 : Concentration de spiramycine (en mg/L) dans les sécrétions mammaires après un traitement au tarissement avec 300 mg d'adipate de spiramycine en pommade intramammaire administré à 16 vaches (Ziv, 1980a).

Chaque point représente la concentration moyenne de spiramycine dans les quatre quartiers de la mamelle d'une seule vache.



La spiramycine est donc une molécule qui franchit très bien les membranes cellulaires et qui se concentre fortement dans les tissus, notamment mammaire.

Les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (2004) d'interprétation des résultats de l'antibiogramme ($c \leq 1$ mg/L et $C > 4$ mg/L) sont inadaptées en ce qui concerne la spiramycine et son utilisation chez les bovins : en effet, celles-ci se réfèrent à des valeurs plasmatiques obtenues en médecine humaine et non pas à des valeurs tissulaires en réalité bien plus élevées chez les bovins.

C'est pourquoi, sur le terrain des discordances sont observées entre le résultat de laboratoire indiquant la « résistance » d'une souche *in vitro* et un succès thérapeutique (Tableau IX).

Tableau IX : Comparaison des CMI de spiramycine pour *S.aureus* et des Streptocoques d'origine bovine et de la concentration mammaire de spiramycine (Merial⁵).

Souches	CMI en mg/L (UI/mL)	Catégorisation clinique ⁶	Mamelle : concentration effective après injection IM de 30 000 UI/kg en mg/L (UI/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,3 (0,96) à 5 (16)	Sensible Intermédiaire Résistant	5* à 61,4 (16* à 19,5)
<i>Streptococcus species</i>	0,03 (0,1) à 2 (6,4)	Sensible à Intermédiaire	

* mammites cliniques avec modification du lait

Des données anciennes attestent d'un effet post-antibiotique de la spiramycine (Videau et Jonchère, 1957 ; Videau, 1978). Pour la plupart des antibiotiques, dès que les concentrations en principe actif diminuent pour passer en dessous des CMI, les bactéries reprennent immédiatement leur croissance. Au contraire, la spiramycine présente la particularité de continuer à inhiber la croissance bactérienne, alors même que sa concentration dans le milieu est redescendue en dessous des CMI des germes considérés. Cet effet peut être

⁶ Trois catégories de souches bactériennes sont définies en fonction de la réponse au traitement antibiotique (CA-SFM, 2004) : - les souches dites sensibles à la spiramycine. La probabilité de succès thérapeutique est alors forte dans le cas d'un traitement par voie systémique à la posologie recommandée ;

- les souches dites résistantes à la spiramycine. La probabilité d'échec thérapeutique est forte ;
- les souches intermédiaires pour lesquelles le résultat thérapeutique est imprévisible.

dû à l'accumulation intracellulaire de la spiramycine et à la stabilité de ses liaisons avec les ribosomes.

A côté de l'effet antibactérien classique, la spiramycine accroît la capacité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles (Desnottes *et al.*, 1988). Après pénétration dans les phagocytes, notamment les polynucléaires neutrophiles, le pH intraribosomal étant plus acide que le pH extracellulaire, les macrolides, bases organiques faibles avec une fonction amine tertiaire, s'ionisent en ammonium quaternaire (NH₄⁺). Les membranes cellulaires étant imperméables aux molécules chargées, les cellules phagocytaires se comportent comme des réservoirs d'antibiotique. Ce phénomène explique les basses concentrations sériques retrouvées lors des dosages. Du fait de leur nombre et de leur rapidité d'action, les neutrophiles sont les premières cellules à migrer de façon sélective vers les foyers infectieux. Le concept de transport « ciblé » de la spiramycine et des macrolides en général est né de cette double constatation. Leur concentration est d'autant plus élevée que les organes sont le siège d'une infection. L'accumulation intracellulaire des macrolides peut être responsable d'une modification de l'activité fonctionnelle des phagocytes, notamment de leur activité antimicrobienne (phagocytose et/ou bactéricidie) (Labro, 1993).

La spiramycine est particulièrement intéressante en médecine bovine où elle est indiquée dans le traitement des infections tissulaires profondes, en particulier celles dues à des germes à Gram positif et à des *Pasteurellacae*. Des essais cliniques ont confirmé son intérêt dans le traitement des mammites cliniques staphylococciques et streptococciques (Laval, 1992).

V. Mécanisme de résistance des coques à Gram positif aux macrolides, lincosamides et streptogramines

Trois mécanismes de résistance sont décrits (Jarlier, 2000) :

- défaut de concentration de l'antibiotique au niveau de sa cible, lié soit à un défaut de pénétration dans la bactérie, soit à un mécanisme d'efflux actif. Il correspond souvent à une résistance naturelle ;

- inactivation par un système enzymatique bactérien ,
- défaut d'affinité entre la cible bactérienne et l'antibiotique

Le support génétique de ces résistances est soit le chromosome, soit des éléments génétiques mobiles : plasmides, transposons, cassettes géniques. Le chromosome est un élément génétique stable, transmis verticalement à la descendance et peu ou pas transférable horizontalement. Les plasmides sont souvent transférables horizontalement, parfois de façon très rapide, mais ils peuvent être perdus par la cellule qui les héberge.

A. Staphylocoques (Nakajima, 1999 ; Bismuth et Leclercq, 2000 ; Weisblum, 2000 ; Leclercq 2002)

Les mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques des staphylocoques d'origine animale ont été rarement caractérisés. Il est admis qu'ils sont identiques à ceux des souches d'origine humaine et que leur mise en évidence peut être faite par les mêmes méthodes.

1) Modification de la cible (phénotype MLS_B) (Leclercq et Courvalin, 1991)

La modification de la cible est le mécanisme de résistance des staphylocoques à l'érythromycine le premier décrit, dès 1956, et le plus répandu. Ce type de résistance résulte de l'acquisition d'un gène *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) : *ermA* ou *ermC*, porté par des transposons (*ermA*) ou par des plasmides (*ermC*). Ce gène code pour une méthylase qui diméthyle l'ARN ribosomal 23S en un seul site, l'adénine 2058. Or, ce résidu est un site de fixation essentiel pour les macrolides. Sa modification réduit l'affinité des macrolides pour la cible, soit en empêchant son accès, soit en modifiant la structure du site de fixation. La résistance conférée est croisée entre les macrolides et des apparentés : les lincosamides et les streptogramines B, du fait de leur site de fixation qui sont communs ou se chevauchent. Pour cette raison, ce phénotype de résistance est dénommé MLS_B . En revanche, le composé A des streptogramines (pristinamycine II et dalfopristine) demeure actif ainsi que l'association des composés A et B (pristinamycine + quinupristine/dalfopristine).

Selon la conformation de l'ARN messenger de la méthylase, le phénotype MLS_B sera inductible ou constitutif. Le phénotype MLS_B constitutif se caractérise par une résistance à

tous les macrolides, aux lincosamides et aux composés B des streptogramines. Les streptogramines (A + B), dont la pristinamycine, restent actives. Cependant, si l'activité bactériostatique de la pristinamycine est peu ou pas touchée comparativement aux souches sensibles à l'érythromycine, l'activité bactéricide de cet antibiotique est altérée. Le phénotype *MLS_B inducible* se caractérise par une résistance aux macrolides inducteurs à 14 atomes (érythromycine, oléandomycine, roxithromycine, clarithromycine) et à 15 atomes (azithromycine) et une sensibilité aux macrolides non inducteurs à 16 atomes (josamycine, spiramycine, tylosine), aux lincosamides et au composant B des streptogramines. Cependant, en présence d'érythromycine ou d'oléandomycine, il y a induction de la résistance *MLS_B* et la souche devient résistante à tous les macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines B. En pratique, cette induction peut être observée par la méthode de diffusion dite des disques par un antagonisme entre l'érythromycine et la lincomycine (Buu-Hoi, 1985).

Le caractère constitutif ou inducible n'apparaît pas lié à la classe du déterminant *erm* mais à la nature de la région régulatrice liée au gène de structure de la méthylase. Des mutations, à des fréquences de l'ordre de 10^{-7} , sont responsables de la modification d'un phénotype *MLS_B inducible* à un phénotype *MLS_B constitutif*.

2) Inactivation enzymatique

a) Lincosamides (phénotype L)

L'acquisition d'une 3-lincomycine (4-clindamycine) nucléotidyltransférase, codée par le gène *lmu(A)* (= *linA* ou *linA'*) plasmidique, modifie ces antibiotiques et confère un haut niveau de résistance à la lincomycine et un bas niveau de résistance à la clindamycine. Ce mécanisme de résistance a été décrit chez *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négatif. La prévalence de ce phénotype – résistance isolée à la lincomycine – serait élevée chez les souches animales de *S. aureus* (Devriese, 1980b).

b) Streptogramines

La résistance enzymatique aux streptogramines est le plus fréquemment liée à l'acquisition de plasmides qui codent pour la synthèse d'une streptogramine A acétyltransférase (gènes *vat*, *vatB* et *vatC*) et/ou d'une streptogramine B hydrolase (gène *vgb* et *vgbB*). La résistance aux streptogramines A est souvent associée à une résistance de type

MLS_B constitutif. ces souches sont résistantes à tous les macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines (phénotype MLS_B + S_A). Le gène *vat* peut être associé au gène *vgb* sur un même plasmide : les souches hébergeant un tel plasmide sont résistantes aux streptogramines (phénotype S_A + S_B) et présentent une résistance intermédiaire aux lincosamides qui pourtant ne sont pas inactivés par les deux enzymes.

Des souches de *S. aureus* de phénotype LS_A (résistance de bas niveau à la lincomycine et aux streptogramines mais sensibilité à la clindamycine dont l'activité bactéricide est néanmoins diminuée) ont été décrites. Le mécanisme de cette résistance n'est pas connu et le(s) gène(s) correspondant sont chromosomiques (El Solh *et al.*, 1984).

c) Macrolides

La résistance par inactivation a été décrite chez *Staphylococcus aureus*. Ces souches résistantes aux macrolides à noyau lactone à 14 et à 16 atomes produisent une estérase (gène *ere-like*) capable d'hydrolyser le noyau lactonique. Une phosphotransférase, codée par le gène *mph(C)*, a aussi été décrite chez *S. aureus* qui modifie les macrolides.

3) Efflux actif

Un mécanisme d'efflux actif est responsable d'une résistance aux macrolides à noyau lactone à 14 et à 15 atomes mais les souches restent sensibles aux macrolides à 16 chaînons et aux lincosamides. Son expression est inductible chez *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négatif. Le gène responsable de cette résistance est *msrA*. La protéine synthétisée agit par un mécanisme d'efflux actif ATP dépendant (transporteurs de la famille ABC). La résistance due au gène *msrA* s'étend aux streptogramines B qui ne sont pas des inducteurs. Des mutants constitutifs ont été mis en évidence. D'autres gènes, *msrB*, gouvernant un efflux actif des macrolides ont été décrits chez les staphylocoques.

Des souches de staphylocoques sont résistantes isolément aux streptogramines A probablement par un mécanisme d'efflux actif (gènes *vgaB* et *vgaB*).

4) Reconnaissance des phénotypes de résistance

Les divers phénotypes de résistance aux MLS des staphylocoques (Tableau X) sont identifiés par l'évaluation de l'activité de l'érythromycine, d'un macrolide à 16 atomes

(spiramycine ou josamycine), d'un lincosamide et de la pristinamycine. Pour le lincosamide, la lincomycine sera préférée à la clindamycine car elle permet de mieux déceler les souches résistantes aux lincosamides et aux streptogramines ou à la lincomycine seule. La réponse pour l'érythromycine est valable pour les autres macrolides à 14 et 15 atomes (dérivés de l'érythromycine et azithromycine) ; la réponse pour le macrolide à 16 atomes est valable pour les autres macrolides à 16 atomes (josamycine, tylosine) ; la réponse pour la lincomycine vaut pour la clindamycine. Il est possible de ne pas inclure de macrolide à 16 atomes dans l'antibiogramme et de faire une lecture interprétative. Le mécanisme par modification de cible est de loin le plus fréquemment mis en évidence chez *S. aureus* alors que les deux autres (inactivation enzymatique et efflux actif) sont rares, voire exceptionnels, et souvent difficiles à détecter par une simple lecture de l'antibiogramme car ils sont souvent associés au premier (Leclercq et Courvalin, 1991).

Tableau X : Principaux phénotypes de résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines chez les staphylocoques (Bismuth et Leclercq, 2000).

Nom du phénotype	Génotype	Mécanismes de résistance	Phénotype conféré					
			Ery	Spi	Lin	Pri I	Pri II	Pri
Sensible	-	Aucun	S	S	S	S	S	S
MLS _B inducible MLS _B constitutif	<i>ermA, C</i>	Modification de cible	R R	S R	S R	S R	S S	S s ²
M	<i>msrA</i>	Efflux actif	R	S	S	s ²	S	S
L	<i>lnuA</i>	Inactivation	S	S	R	S	S	S
S _A + S _B	<i>vat, vatB + vgb</i>	Inactivation	S	S	S	R	R	R
LS _A	Inconnu	Inconnu	S	S	I/R	S	R	I/R
S _A	<i>vga, vgaB</i>	Efflux probable	S	S	S	S	R	S/I

Ery : érythromycine ; Spi : spiramycine ; Lin : lincomycine ; Pri I : pristinamycine facteur I (ou B) ; Pri II : pristinamycine facteur II (ou A) ; Pri : pristinamycine
²s : bactéricidie altérée pour certaines souches

B. Streptocoques (Nakajima, 1999 ; Leclercq, 2000 ; Leclercq, 2002)

La plupart des données sur la résistance des streptocoques aux macrolides concerne le pneumocoque

1) Modification de la cible (phénotype MLS_B)

En France, le mécanisme le plus fréquent de résistance des streptocoques aux macrolides et aux molécules apparentées est une modification de l'ARN ribosomal 23S par une méthylase d'origine bactérienne, ce qui diminue l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. La résistance concerne tous les macrolides à 14, 15 et 16 atomes, les lincosamides et le composant B des streptogramines. Les streptogramines peuvent néanmoins être utilisées en thérapeutique, l'activité du composant A n'étant pas modifiée et la synergie entre les deux facteurs A et B conservée.

La résistance MLS_B chez les streptocoques peut être de type constitutif ou inducible. Contrairement à ce qui est observé chez les staphylocoques, de nombreuses molécules sont des inducteurs et, par conséquent, quel que soit le mode d'expression de la résistance, elle est croisée entre les antibiotiques du groupe MLS_B. Les kétolides, dont la télithromycine, sont de mauvais inducteurs (Rosato *et al.*, 1998) et restent actifs sur les streptocoques de phénotype MLS_B inducible. Des phénotypes extrêmement variés sont observés lors de la réalisation d'antibiogrammes par diffusion en raison d'une plus ou moins bonne capacité inductrice des différentes molécules (Buu-Hoï, 1985). La distinction phénotype inducible/constitutif ne peut être faite que par des méthodes étudiant spécifiquement l'induction. Par la méthode d'antibiogramme par diffusion, un phénomène d'antagonisme entre l'érythromycine et la lincomycine peut être mis en évidence si on a un phénotype MLS_B inducible, avec une recroissance après 48 heures d'incubation autour du disque de lincomycine. Dans quelques cas, la résistance inducible peut s'exprimer à un niveau moindre pour la clindamycine qui apparaît active. L'observation de cette dissociation dépend du milieu utilisé et est favorisée par l'incubation en atmosphère normale sans CO₂ (Jones *et al.*, 1996). La fréquence relative du phénotype inducible n'est pas connue mais il est sans doute prédominant en France par rapport au phénotype constitutif (Rosato *et al.*, 1999).

Ce mécanisme de résistance croisée a été décrit chez *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, des streptocoques C, F et G, *Streptococcus*

bovis et des streptocoques non groupables. Le gène *ermB* (initialement appelé *ermAM*) est beaucoup plus répandu que le gène *ermTR* (groupe *ermA*)

Les gènes codant pour les méthylases sont le plus souvent situés sur des transposons – conjuguatifs ou non – portés par le chromosome et, éventuellement, par des plasmides.

2) Efflux actif (phénotype M)

Le mécanisme de résistance par efflux actif lié à la présence du gène *mefA* (= *mefE*) (*mef* pour macrolide efflux) a été mis en évidence chez *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, des streptocoques oraux et des streptocoques des groupes C et G. La protéine MefA appartient à la famille MFS (Major Facilitator Superfamily). La pompe comporte douze domaines transmembranaires. Cette pompe utilise la force proton motrice pour rejeter activement les macrolides à 14 et 15 atomes hors du cytoplasme bactérien.

La spécificité de cette pompe fait que la résistance n'affecte que les macrolides à noyau à 14 et 15 atomes. La résistance est inductible par ces macrolides. Les souches restent sensibles aux macrolides à 16 atomes, aux lincosamides, aux streptogramines B et aux kétolides même après induction par l'érythromycine, car ces antibiotiques ne semblent pas être des substrats de la pompe.

La résistance à l'érythromycine, de niveau souvent modéré (CMI d'érythromycine = 8-16 mg/L), associée à la sensibilité à la spiramycine ou à la josamycine et à la clindamycine sans antagonisme entre ces antibiotiques et l'érythromycine définit le phénotype M. Le phénotype MLS_{Bi} se distingue donc du phénotype d'efflux par l'existence d'un antagonisme entre l'érythromycine et la spiramycine ou la lincomycine visible par la méthode d'antibiogramme par diffusion. Les phénotypes de résistance des streptocoques aux macrolides, lincosamides, synergistines et kétolides sont rapportés dans le tableau XI.

Tableau XI : Génotypes et phénotypes de résistance aux macrolides et antibiotiques apparentés chez les streptocoques (Canu et Leclercq, 2002).

Génotype	Phénotype	Mécanisme de résistance	M ₁₄ M ₁₅	K	M ₁₆	L	S _B	S _A	S
<i>ermB</i>	MLS _B (c) MLS _B (i)	Modification de cible	R R	R S	R R	R R	R R	S S	S S
<i>mefA</i>	M	Efflux actif	R	S	S	S	S	S	S

(c) constitutif ; (i) inductible

M₁₄, M₁₅, M₁₆ : macrolides à 14, 15 et 16 atomes ; K : kétolides ; L : Lincosamides ; S : streptogramines (A + B) ; S_B : streptogramines B ; S_A : streptogramine A

R : résistant ; S : sensible

3) Résistance par mutation des cibles

L'étude de divers mutants de pneumocoques sélectionnés *in vitro* par différents macrolides avait révélé que plusieurs des structures qui participent aux sites de liaison des macrolides (les domaines II et V de l'ARN 23S et les protéines L22 et L4) pouvaient présenter des mutations qui étaient responsables de la résistance aux MLS. La plupart des mutations affectaient l'ARN 23S. Elles étaient similaires à celles décrites chez d'autres espèces bactériennes (Vester et Douthwaite, 2001). La plupart des espèces concernées par la résistance aux macrolides par mutation des cibles n'ont qu'une à deux copies de l'opéron codant l'ARN 23S alors que le génome du pneumocoque porte quatre copies.

Ultérieurement, des isolats cliniques de pneumocoques présentant une mutation :

- de l'ARN 23S et résistants soit aux macrolides à 14, 15 ou 16 atomes et aux lincosamides, soit aux macrolides à 16 atomes et aux composants A et B des streptogramines

- de la protéine ribosomale L4 et résistants aux macrolides à 14, 15 ou 16 atomes et au composant B des streptogramines (et pour une souche à la télichromycine en plus)

ont été isolés chez des malades en Europe et aux Etats-Unis (Tait-Kamradt *et al.*, 2000 ; Depardieu et Courvalin, 2001 ; Canu et Leclercq, 2002).

Des expériences de transformation par des gènes de l'ARN 23S mutés ont montré que la sensibilité aux macrolides diminuait en fonction du nombre de copies mutées et qu'une résistance franche n'était obtenue qu'avec un minimum de deux copies mutées (Tait-Kamradt *et al.*, 2000 ; Canu *et al.*, 2002).

Le phénotype de résistance conféré par mutation des cibles varie en relation avec la mutation et le nombre de copies mutées mais concerne toujours plusieurs molécules du groupe MLS (Canu et Leclercq, 2002).

VI. Résistance aux macrolides et apparentés des coques à Gram positif responsables d'infections mammaires chez la vache

De nombreuses études ont évalué la fréquence de résistance aux macrolides et apparentés de souches de *S. aureus*, *S. uberis* et *S. dysgalactiae* isolées lors d'infections mammaires chez la vache. Des synthèses bibliographiques rapportent les principales données publiées avant 2000 pour les staphylocoques (Guérin-Faublée et Brun, 1999) et les streptocoques (Bouveron, 2000).

Il faut se garder de pousser trop loin la comparaison des différents résultats. En effet, les techniques utilisées sont multiples : technique de diffusion dite des disques, mesure des CMI soit par la méthode de référence de dilution en milieu gélosé, soit par une technique de microdilution en milieu liquide. Les auteurs n'ont pas eu recours dans tous les cas à des techniques standardisées associées à un contrôle de qualité. De plus, les critères de catégorisation clinique diffèrent d'un pays à l'autre et il n'est pas toujours précisé si les souches intermédiaires sont catégorisées avec les résistantes. Ainsi, seules les tendances générales peuvent être dégagées et les différences observées dans les fréquences de résistance ne peuvent que rarement être reliées à la nature du prélèvement, sur un animal sain ou malade, ou à une évolution dans le temps ou encore être rapportées à de réelles différences régionales.

A. *Staphylococcus aureus*

Globalement, les souches bovines de *Staphylococcus aureus* d'origine mammaire n'avaient pas évolué vers la résistance quelle que soit l'origine géographique et la source des prélèvements, avec aucune souche résistante aux macrolides et à la lincomycine dans certaines études ou des fréquences basses de 2 à 5 % (Guérin-Faublée et Brun, 1999).

Ceci reste vrai dans les études plus récentes (Devriese *et al.*, 1997 ; Gentilini *et al.*, 2000 ; Erskine *et al.*, 2002 ; Yoshimura *et al.*, 2002) (Tableau XII) avec des fréquences de résistance inférieures à 10 %. Erskine *et al.* (2002) ont même observé une augmentation de la sensibilité à l'érythromycine de souches de *S. aureus* isolées de mammites bovines aux USA.

En France, d'après les données du RESAPATH (AFSSA), 86 % des souches bovines de staphylocoques à coagulase positive et 91 % des souches de staphylocoques à coagulase négative isolées en 1999-2000 (dont la majorité doivent provenir d'infections mammaires)

étaient sensibles à l'érythromycine, 30 % et 49 % à la spiramycine, 96 % et 73 % à la lincomycine

Tableau XII : Fréquences de résistance (en %) aux macrolides et apparentés de souches de *Staphylococcus aureus* isolées de sécrétions mammaires chez la vache.

	Devriese <i>et al.</i> (1997) CMI + diffusion n = 250 à 464 Belgique 1980-1996 Mammites	Erskine <i>et al.</i> (2002) Diffusion n = 579 à 832 Etats-Unis 1994-2000 Mammites	Gentilini <i>et al.</i> (2002) Diffusion n = 206 Argentine 1996-1998 Mammites cliniques et subcliniques	Yoshimura <i>et al.</i> (2002) Dilution en milieu gélosé n = 51 Japon Mammites
Erythromycine	3 à 12	6,9	11,6	3,9
Tylosine				0
Lincomycine	3 à 10			0
Clindamycine				0
Pirlimycine		2,1	7,7	

B. *Streptococcus uberis*

Selon les données publiées avant 2000, pour *Streptococcus uberis*, la fréquence de résistance à l'érythromycine variait de 2 à 25 %, de 8 à 13 % pour la spiramycine et de 0 à 18 % pour la lincomycine (Bouveron, 2002).

En France, en 1999-2000, les fréquences de résistance à l'érythromycine atteignaient 25 à 26 % selon les données de l'AFSSA et 27 à 37 % pour la lincomycine. Les données sont à rapprocher de celles publiées par Guérin-Faubleé *et al.* (2002) : 28 % pour l'érythromycine et 42 % pour la lincomycine. Il semble donc qu'il y ait eu une nette augmentation de la résistance aux macrolides et apparentés chez *S. uberis*, au moins en France, Ganière *et al.* (1988) n'ayant mis en évidence dans les années 80 que 2 % de souches résistantes à l'érythromycine et aucune résistante à la lincomycine. Aux USA, seulement 68 % des souches étaient sensibles à l'érythromycine et 80 % à la pirlimycine ; une diminution significative de la prévalence de souches résistantes a été notée pour cette dernière molécule (Erskine *et al.*, 2002).

C. *Streptococcus dysgalactiae*

Dans les articles publiés avant 2000, les fréquences de résistance à l'érythromycine, à la spiramycine ou à la lincomycine variaient de 0 à 15,6 %, les fréquences les plus élevées ayant été rapportées en France. En 1999-2000, 83 % des souches évaluées dans une étude française étaient sensibles à l'érythromycine et 88 % à la lincomycine (Guérin-Faublée *et al.*, 2002).

D'après Erskine *et al.* (2002), aux Etats-Unis, la sensibilité de *Streptococcus dysgalactiae* à l'érythromycine a augmenté de 73 % en 1994 à 87 % en 2000, celle à la pirlimycine restant stable (89 %).

D. Mécanismes de résistance

Peu d'études décrivent les phénotypes de résistance aux macrolides et apparentés pour les souches animales.

Des souches de *Staphylococcus aureus* de phénotype MLS_B constitutif ont été décrites (Devriese, 1976 ; Buragohain et Dutta, 1990). Des souches de phénotype LS_A, avec une résistance à bas niveau à la lincomycine et au composant A des streptogramines, ont été rapportées par Devriese (1980a), ainsi que des souches résistantes isolément aux lincosamides (Buragohain et Dutta, 1990).

Des souches de *S. uberis* et de *S. dysgalactiae* résistantes à haut niveau aux macrolides (érythromycine, spiramycine) et à la lincomycine de phénotype MLS_B ont été caractérisées (Guérin-Faublée *et al.*, 2002). Ces souches représentaient la majeure partie des souches résistantes aux macrolides et apparentés (14 sur 21). Chez des souches de streptocoques de ce phénotype, Roberts et Brown (1994) ont mis en évidence, après amplification génomique en chaîne, les déterminants *ermBP* et *ermFS*, qui étaient transférables par conjugaison. Le gène *ermQ* a été mis en évidence chez une autre souche résistante à l'érythromycine après induction par la lincomycine.

Des souches de *Streptococcus dysgalactiae* résistantes isolément à bas niveau à l'érythromycine (CMI = 1 mg/L) ont été décrites (2 sur les 7 résistantes à l'érythromycine), qui pourraient présenter un mécanisme d'efflux actif (Guérin-Faublée *et al.*, 2002).

Guérin-Faublée *et al.* (2002) ont décrit des souches de *S. uberis* résistantes isolément à la lincomycine, soit à haut niveau (CMI \geq 128 mg/L), soit à bas niveau (CMI = 2-4 mg/l) pouvant correspondre à un phénomène d'inactivation enzymatique et Roberts et Brown (1994), une souche de *S. agalactiae* résistante à haut niveau à la seule lincomycine.

Dutta et Devriese (1982) ont isolé une souche de *S. dysgalactiae* de phénotype ML, résistante à bas niveau aux macrolides et à haut niveau aux lincosamides et une souche de *S. uberis* de phénotype MLS, résistante aux macrolides, aux lincosamides et aux composants A et B des synergistines, cette souche était capable d'inactiver la lincomycine mais pas la virginiamycine (composant A).

Des phénotypes de résistance très particuliers ont donc été rapportés chez des souches animales.

En France, des souches de *S. uberis* ayant des CMI de spiramycine élevées ($\times 16$ par rapport aux souches de phénotype sauvage) catégorisées « intermédiaires » ont été décrites (Morvan *et al.*, 1997 ; Bouveron, 2000) ; leur phénotype ne correspond pas à un phénotype décrit. De plus, la fréquence de résistance à la spiramycine de souches de staphylocoques isolées de mammites rapportée par l'AFSSA est beaucoup plus élevée que la fréquence de résistance à l'érythromycine, ce qui est en désaccord avec le fait que les souches résistantes sont en majeure partie des souches MLS_B.

Cette étude se proposait ainsi de réévaluer la sensibilité à la spiramycine de souches isolées d'infections mammaires chez la vache et de comparer les résultats obtenus avec ceux de la littérature.

**EVALUATION DE
L'ACTIVITE DE LA
SPIRAMYCINE SUR DES
COQUES A GRAM POSITIF
ISOLES LORS D'INFECTIONS
MAMMAIRES CHEZ LA
VACHE**

ETUDE EXPERIMENTALE

L'activité de la spiramycine sur des souches de coques à Gram positif isolées de mammites cliniques chez la vache a été évaluée, en 2004-2005, par le laboratoire de bactériologie de la Faculté de médecine Lyon-Sud (UMR-CNRS 5558, Pr Flandrois) dans le cadre d'un contrat entre la société EZUS-Lyon 1 et le laboratoire Merial (Dr J-J Pravieux)

I. Matériels et méthodes

A. Souches bactériennes

1) Souches cliniques

L'étude a porté sur 94 isolats : 47 souches de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, 43 souches de *Streptococcus uberis* et 4 souches de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Ces souches ont été isolées en 2003 ou 2004 à partir de prélèvements de laits de vaches atteintes de mammites cliniques, par huit laboratoires de biologie vétérinaire (Tableau XIII). Ce sont donc des isolats récents d'origine géographique variée.

D'après les résultats des antibiogrammes réalisés par les laboratoires par la technique des disques, une majorité de souches catégorisées intermédiaires pour la spiramycine avait été retenue :

- sept souches de *Staphylococcus aureus* étaient résistantes à la spiramycine (diamètre < 19 mm), 32 intermédiaires (diamètre \geq 19 mm et < 24 mm), deux sensibles (diamètre \geq 24 mm) et six de sensibilité inconnue. Le diamètre de la zone d'inhibition était de 19 mm pour une souche intermédiaire, de 20 mm pour deux souches, 21 mm pour 10 souches, 22 mm pour six souches et 23 mm pour 13 souches.

- 20 souches de *Streptococcus uberis* étaient résistantes à la spiramycine (diamètre < 19 mm), 17 intermédiaires (diamètre \geq 19 mm et < 24 mm), cinq sensibles (diamètre \geq 24 mm) et une de sensibilité inconnue. Les diamètres de la zone d'inhibition pour les souches résistantes et intermédiaires étaient régulièrement répartis de 6 mm à 23 mm.

- une souche de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* était résistante à la spiramycine, deux intermédiaires et une sensible.

L'isolement avait été réalisé par les laboratoires selon les normes préconisées pour l'application du programme d'accréditation n°116 du COFRAC (CNEVA, 1996). Il est en particulier stipulé que le prélèvement est constitué par le lait individuel d'un seul quartier et que l'association de trois espèces bactériennes étant tout à fait exceptionnelle, celle-ci doit

conduire à poser le problème de la qualité du prélèvement (en d'autres termes, en présence d'un prélèvement polymicrobien, un deuxième prélèvement doit être demandé). L'application de ce texte de référence permet de fortement suspecter le rôle étiologique de l'espèce bactérienne isolée (ou éventuellement des deux espèces isolées) dans la mammité. Les souches redondantes ont été éliminées en demandant aux laboratoires de ne fournir, pour chaque espèce bactérienne, qu'une souche isolée à partir du même élevage la même année ; les souches testées peuvent donc être considérées comme épidémiologiquement indépendantes.

L'identification des souches a été réalisée par les Laboratoires Vétérinaires Départementaux. Après vérification de la pureté des isolats, cette identification a été confirmée à la Faculté de Médecine Lyon-Sud par la réalisation d'une coloration de Gram, la recherche de la catalase, pour *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence d'une DNase thermostable inhibée par des anticorps spécifiques (Flandrois et Chomarat, 1984), et pour les streptocoques par la réalisation d'une galerie Api20 Strep® (bioMérieux, 69 Marcy l'Etoile) et éventuellement d'un sérogroupage par Slidex® (bioMérieux).

La galerie Api20 Strep® (bioMérieux) comprend les tests suivants :

- la fermentation de sucres : ribose, arabinose, mannitol, sorbitol, lactose, tréhalose, inuline, raffinose, amidon et glycogène ;
- l'hydrolyse de l'esculine et de l'acide hippurique ;
- la production d'acétoïne à partir du pyruvate ;
- la détermination de l'hydrolyse de l'arginine ;
- la recherche des enzymes : pyrrolidonyl arylamidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -galactosidase, phosphatase alcaline et leucine aminopeptidase.

Tableau XIII Origine géographique des souches cliniques testées.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>	<i>S. dysgalactiae</i>
LDA 01	2	1	
LDA 35	19	14	1
LVD 53	1	7	1
LVD 57	1	2	
LVD 69			1
Biovac Anilab	15	12	
Villaines La Juhel	9	5	1
Laboratoire Vétérinaire du Haut-Anjou		2	
Total	47	43	4

2) Souches de référence

a) Contrôle de qualité de l'antibiogramme

Lors de chaque mesure de CMI et lors de chaque série d'antibiogrammes par diffusion, deux souches de référence ont été testées pour le contrôle de qualité : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

b) Identification *S. uberis* / *S. parauberis*

Les deux souches-types *S. uberis* CIP 103 219 (Institut Pasteur, 75 Paris) et *S. parauberis* CIP 103 956 (Institut Pasteur) ont été utilisées comme références pour le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S.

3) Conservation

Les souches cliniques ont été conservées en gélose conservation (Bio-Rad, 92 Marnes-la-Coquette) à + 4 °C. Les souches de référence étaient conservées à -196° C en bouillon coeur-cerveille (Bio-Rad) supplémenté par 10 % (vol/vol) de glycérol.

B. Identification de *S. uberis* et *S. parauberis*

Les deux espèces, *Streptococcus uberis* et *Streptococcus parauberis*, autrefois dénommés *S. uberis* types I et II, sont des agents causals de mammites cliniques chez la vache. Ces deux espèces sont presque impossibles à distinguer en s'appuyant sur leurs

caractéristiques biochimiques et sérologiques (Williams et Collins, 1990). Le seul caractère phénotypique discriminant est la recherche de la croissance à + 10 °C. Aussi, la majorité des laboratoires ne fait pas la distinction entre ces deux espèces et ils les désignent globalement sous le terme de « *Streptococcus uberis* ».

Ces deux espèces peuvent aujourd'hui être différenciées par des techniques de biologie moléculaire (Leigh, 1999) en particulier des PCR (Polymerase Chain Reaction) spécifiques, avec amplification de l'espace intergénique ARN 16S – ARN 23S ou des gènes codant pour l'ARN 16S ou l'ARN 23S (Hassan *et al.*, 2001) ou en utilisant des amorces spécifiques de *sodA* et de *cpn60* (Alber *et al.*, 2004). Il apparaît que *S. parauberis* est très minoritaire par rapport à *S. uberis* dans les infections mammaires de la vache, avec une fréquence relative d'isolement allant de 0 à 10 % selon les enquêtes. Ces infections présentent un caractère plus chronique que celles dues à *S. uberis* (Leigh, 1999).

L'identification moléculaire a été faite au laboratoire par séquençage d'une portion du gène codant pour l'ARN 16S après amplification de l'ADN par PCR.

1) Souches bactériennes

L'étude a porté sur les deux souches-types *S. uberis* CIP 103219 et *S. parauberis* CIP 103956 et sur six souches cliniques identifiées comme « *Streptococcus uberis* » d'après les résultats des galeries Api20 Strep® analysés grâce au logiciel d'identification Apilab (bioMérieux). Les six souches cliniques ont été choisies selon les deux critères suivants (Tableau XIV) :

- origine géographique variée avec des isolats considérés comme non apparentés épidémiologiquement ;

- valeurs des CMI de spiramycine préalablement mesurées : trois avaient des CMI basses (CMI=0,5 mg/L) et trois des CMI correspondant à des résistances de bas niveau (CMI=8 mg/L).

Tableau XIV Caractéristiques des souches de « *Streptococcus uberis* » identifiées par séquençage du gène codant pour l'ARN16S.

Souche	Origine	CMI (mg/L)	Catégorisation clinique
54	Biovac Anilab	0,5	Sensible
72	Laboratoire Vétérinaire du Haut-Anjou	0,5	Sensible
88	LVD 35	0,5	Sensible
66	Villaines La Juhel	8	résistance à bas niveau
76	LVD 35	8	résistance à bas niveau
78	LVD 53	8	résistance à bas niveau

Avant l'extraction de l'ADN, les souches ont été cultivées à 35 ± 1 °C pendant 18 heures sur une gélose Columbia supplémentée par 5 % de sang de mouton défibriné (bioMérieux).

2) Extraction de l'ADN chromosomique

Cette extraction constitue une étape préliminaire à la PCR. Certaines précautions sont prises en raison des risques de contamination : port de gants, autoclavage du matériel, usage de pipettes avec pointes filtres stériles.

Dans des tubes à PCR de 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), ont été introduits :

- 50 µL d'une suspension de bactéries d'opacité équivalente à l'échelon 2 de la gamme de Mc Farland ;
- 2 µL d'achromopeptidase (Sigma Aldrich, 38 Saint Quentin Fallavier).

Les tubes ont été mis à incuber à 55 °C pendant 15 minutes au bain marie à sec (Leb Line, Melrose Park, USA), puis centrifugés (centrifuge 5417R, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) à 2000 g pendant deux minutes. Après centrifugation, le surnageant de chaque tube a été récolté puis transféré dans un tube pour une mesure spectrophotométrique.

La concentration d'ADN et sa pureté sont évaluées par spectrophotométrie (BioPhotometer, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) en mesurant à 260 nm et à 280 nm la

densité optique (DO) d'une dilution au 1/50^e et 1/100^e de la solution à doser. Le calcul suivant permet de déduire la concentration en ADN :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/mL}) = 50 \times (\text{facteur de dilution}) \times \text{DO}_{260\text{nm}}$$

La mesure de la DO à 280 nm permet de s'assurer de l'absence de « contamination » significative par des protéines. Le rapport $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ doit être compris entre 1,7 et 2. S'il est inférieur à 1,7, il existe une « contamination » qui impose de pratiquer une seconde extraction. Un rapport supérieur à 2 témoigne de la présence d'une quantité importante d'ARN.

Les résultats des extractions pour les huit souches étudiées sont rapportées dans le tableau XV.

Tableau XV : Concentration et pureté en ADN des huit souches testées.

	<i>S. uberis</i> ATCC	<i>S. parauberis</i> ATCC	54	66	72	76	78	88
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	125,4	13,9	218,1	157	730	102,2	420	930
Pureté	1,51	1,54	1,23	1,43	1,51	1,56	1,09	1,42

Les rapports $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ s'étaient de 1,09 à 1,56. Aucune extraction supplémentaire n'a néanmoins été pratiquée.

La concentration retenue pour une amplification optimale est de l'ordre de 150 $\mu\text{g/ml}$. La gamme des concentrations obtenues est large et les extraits ont été gardés tels quels pour la suite des manipulations.

3) Amplification du fragment 16S : technique de PCR

Le but de cette étape est d'amplifier la partie terminale des gènes codant pour l'ARN 16S. L'amplicon obtenu aura une taille de 473 paires de bases (sachant que le gène codant pour l'ARN 16S a une taille d'environ 1500 paires de bases). Cette étape est indispensable car la concentration en ADN initiale est trop faible pour que le séquençage puisse être réalisé directement.

Les caractéristiques des deux amorces utilisées sont résumées dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S.

Amorces	Séquence	% GC	Longueur
16S (1)	TCA AAK GAA TTG ACG GGG GC (911-930)	50	20
16S (2)	GCC CGG GAA CGT ATT CAC (1388-1370)	61	18

Le mélange réactionnel (Tableau XVII) est préparé dans un tube PCR de 1,5 mL (Sarstedt) puis réparti dans des tubes PCR 0,5 mL (ABgene House, Surrey, Angleterre) sous la hotte dans la zone propre du laboratoire.

Tableau XVII : Composition du mélange réactionnel pour la PCR.

Réactifs	Concentration à obtenir par tube	Pour un tube (50 µL) (volume en µL)
PCR MasterMix Roche (Branchburg NJ, USA)	Tampon PCR = 1× Taq polymérase = 1,25 U dNTP = 0.2 mM Tris-HCl = 10 mM KCl = 50 mM MgCl ₂ = 1.5 mM	25
MgCl ₂ 25 mM Roche	1 mM	2
Primer 16S1 10 µM MWG (Ebersberg. Allemagne)	0,2 µM	1
Primer 16S2 10 µM MWG	0,2 µM	1
Eau Roche		19

Deux µL du surnageant (récolté suite à l'étape d'extraction de l'ADN) sont introduits dans 48 µL de mélange réactionnel, dans la zone 2 du laboratoire (zone où sont manipulés des bactéries ou de l'ADN). Un contrôle négatif est réalisé en introduisant uniquement 50 µL de mélange réactionnel dans le tube à PCR.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Hybaid, Wallosellen, Suisse) et le programme utilisé (Tableau XVIII) adapté aux amorces 16S.

Tableau XVIII : **Programme d'amplification.**

1 cycle	5 minutes à 94 °C
35 cycles	30 secondes à 94 °C 30 secondes à 55 °C 30 secondes à 72 °C
1 cycle	5 minutes à 72 °C

L'amplification était de 2 heures et 45 minutes.

Chaque cycle est composé :

- d'un temps de dénaturation de l'ADN à 94 °C ;
- d'un temps d'hybridation avec les amorces à 55 °C ;
- d'un temps d'élongation à 72 °C.

Tous les cycles sont effectués dans le même tube, en présence d'un large excès d'amorces, de nucléotides et de Taq polymérase (correspondant au mélange réactionnel).

Chaque cycle produit un doublement de la séquence comprise entre les deux amorces. L'amplification est donc exponentielle : au bout de N cycles, on obtient théoriquement 2^N exemplaires du segment d'ADN dont les extrémités sont définies par les extrémités 5' des amorces utilisées.

4) Détection des produits amplifiés par électrophorèse

La quantité d'ADN amplifié est telle qu'il peut être visualisé sur un gel d'électrophorèse. Si on utilise plusieurs couples d'amorces dans le mélange réactionnel, chaque couple va générer des séquences de longueur, donc de poids moléculaire (en paires de bases) différent : le gel d'électrophorèse va présenter autant de bandes que d'amplicons différents. Dans notre étude, un seul couple d'amorces a été utilisé engendrant une unique bande sur le gel.

L'électrophorèse a trois objectifs :

- contrôler l'absence de contaminants en vérifiant que le témoin négatif ne présente pas de bandes ;

- vérifier que l'amplification est spécifique de la cible visée, avec présence de bandes de poids moléculaires identiques à ceux attendus ; ici l'amplicon attendu a une taille de 473 pb ,
- estimer la quantité d'ADN obtenue par l'intensité de la fluorescence de la bande : cette méthode est plus qualitative que quantitative.

L'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose à 1,2 % (E-gel, Invitrogen, 95 Cergy Pontoise). Après l'amplification, le gel est préchauffé. Trois μL de l'amplicon sont déposés dans chaque puits puis 15 μL d'eau sont ajoutés. Pour chaque gel, 5 μL d'un marqueur de poids moléculaire sont ajoutés (SmartLadder, Eurogentec, Seraing, Belgique). Au bout de 30 minutes, la présence d'une bande est vérifiée pour les tests et l'absence de bande pour le témoin négatif. La visualisation du gel est réalisée par transillumination par des rayons ultraviolets ($\lambda \approx 300 \text{ nm}$). La comparaison avec le marqueur de poids moléculaire permet de déterminer la taille de chaque amplicon et d'estimer leur quantité.

L'absence de bande pour le contrôle négatif a permis de dire qu'il n'y avait pas eu « contamination » au cours de la manipulation. Pour chaque produit d'amplification, une seule et unique bande a été observée. La taille de chaque amplicon se situait entre 400 et 600 paires de bases, résultat en accord avec la taille de l'amplicon théorique attendu (473 pb). L'intensité de la fluorescence nous a permis de quantifier l'ADN pour chaque bande, qui était comprise entre 15 et 30 ng.

5) Séquençage

Les tubes PCR utilisés pour l'amplification sont envoyés à Biofidal (69 Vaulx en Velin) pour le séquençage. Le matériel reçu est purifié puis le séquençage est réalisé par électrophorèse capillaire avec marquage des acides nucléiques par des molécules fluorescentes. Le chromatogramme obtenu (fluorescences différentes suivant les bases azotées) permet de déduire la séquence du gène.

C. Mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

La CMI correspond à la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible à l'œil nu après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C.

Les valeurs de CMI ont été déterminées par la technique de référence de dilution en milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 1996).

1) Antibiotiques

L'activité de :

- cinq macrolides,
 - * un macrolide en C₁₄ : l'érythromycine
 - * un macrolide en C₁₅ : l'azithromycine
 - * trois macrolides en C₁₆ : la spiramycine, la tylosine et la josamycine
- deux lincosamides : la lincomycine et la clindamycine,
- une synergistine : la pristinamycine,

a été évaluée par la mesure des CMI (Tableau XIX).

Tableau XIX : Origine et préparation des antibiotiques.

Antibiotique	Origine	Titre	Solvant	Diluant
Erythromycine	Abbott France 28 St Rémy sur Avre	0,964	Ethanol	Eau
Azithromycine	Pfizer Groton, Angleterre	0,954	Ethanol	Bouillon de Mueller-Hinton
Spiramycine	Aventis Pharma 94 Vitry sur Seine	4683 UI/mg	Ethanol	Eau
	Mérial 31 Toulouse	4634 UI/mg		
Tylosine	Lilly Elanco 92 Suresnes	0,978	Ethanol	Eau
Josamycine	Bayer Pharma 92 Puteaux	996 U/mg	Ethanol	Eau
Lincomycine	Pharmacia 78 Guyancourt	600 mg/2 ml	Eau	Eau
Clindamycine	Pfizer Sandwich, Angleterre	1	Eau	Eau
Pristinamycine	Aventis Pharma 94 Vitry sur Seine	0,819	Ethanol	Eau

Les titres des poudres de spiramycine sont le plus souvent exprimés en UI/mg. Dans les années 80, les laboratoires disposaient d'un étalon OMS de spiramycine et un mg équivalait à 3 200 UI. La correspondance 1 UI = 0,0003125 mg n'est plus valable actuellement (Aventis Pharma, communication personnelle), les procédés de purification et les méthodes de titrage biologique ayant évolué. Le lot 6013SS fourni par Aventis Pharma de

titre égal à 4 683 UI/mg avait un titre en spiramycine I+II+III de 0,953 (sur extrait sec) déterminé par HPLC ; il contenait 0,2 % d'eau. C'est sur ce titre déterminé par HPLC que le laboratoire s'est basé pour la pesée de la spiramycine pour la préparation de la solution-mère lors des premières mesures de CMI. Ultérieurement, une poudre titrée fournie par Merial a été utilisée. Le lot 4SE568 présentait une bonne stabilité, alors que certains lots peuvent perdre 10 % du titre en 4-5 mois (Françoise Bosc, Merial, communication personnelle). Compte tenu des données fournies par le bulletin d'analyse d'Aventis Pharma, il a été considéré que le titre de 4 634 UI/mg correspondait à un titre à 0,941 mg/mg de poudre.

Les antibiotiques ont été solubilisés puis dilués selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (1996) (Tableau XIX).

La gamme des concentrations testées s'étendait :

- pour les staphylocoques, de 0,015 à 128 mg/L pour l'érythromycine, de 0,12 à 128 mg/L pour la lincomycine, de 0,25 à 512 mg/L pour la spiramycine et de 0,03 à 128 mg/L pour la pristinamycine ;

- pour les streptocoques, de 0,008 à 128 mg/L pour l'érythromycine, de 0,03 à 128 mg/L pour la lincomycine, de 0,12 à 512 mg/L pour la spiramycine, de 0,015 à 128 mg/L pour l'azithromycine et la pristinamycine et de 0,03 à 256 mg/L pour la tylosine, la josamycine et la clindamycine.

2) Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé était la gélose de Mueller-Hinton (Bio-Rad) pour la détermination des CMI pour les staphylocoques, et le même milieu supplémenté par 5 % de sang de mouton défibriné (bioMérieux) pour la détermination des CMI pour les streptocoques.

3) Préparation de l'inoculum

Les inoculums ont été préparés à partir d'une culture de 18-24 h sur gélose Columbia (bioMérieux) pour les staphylocoques, et sur gélose Columbia additionnée de 5 % de sang défibriné de mouton (bioMérieux) pour les streptocoques. Les bactéries sont alors en phase stationnaire de croissance. Chaque souche a été mise en suspension dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, 38 Saint Quentin Fallavier) de pH=7. Une

suspension d'opacité équivalente à l'échelle 0,5 de la gamme de Mc Farland a été préparée (10^8 UFC/mL) puis diluée au $1/100^{\text{ème}}$

4) Ensemencement

Après avoir été séchées 30 minutes à 37 °C à l'étuve, les boîtes de Petri ont été ensemencées manuellement à l'aide d'un appareil de Steers déposant 10 µL par spot. L'inoculum final avait donc une taille de 10^4 UFC (Unité Formant Colonie). Un « témoin eau » (5 mL d'eau + 45 mL de gélose) a été ensemencé puis les différentes dilutions d'un antibiotique en allant de la plus faible concentration à la plus forte. Un deuxième « témoin eau » a été alors réalisé.

5) Incubation

L'incubation a été faite à 35 ± 1 °C en présence d'air. Le CA-SFM (2004) préconise depuis relativement peu d'années de faire l'incubation en présence de 5 % de CO₂ pour les streptocoques ; cette recommandation n'a pas été suivie car il est établi que l'activité des macrolides est inhibée par des pH acides (Rosenblatt et Schoenknecht, 1972 ; Traub et Leonhard, 1995). Cette recommandation a été modifiée dans le communiqué 2005 du CA-SFM : l'ajout de CO₂ préconisé pour l'incubation des streptocoques, a été supprimé.

6) Lecture

La lecture des résultats a été faite après 18 heures d'incubation pour les staphylocoques et à 24 et 48 heures pour les streptocoques. En effet, pour les streptocoques, la résistance par méthylation de l'ARN 23S (phénotype MLS_B) est souvent inductible et dans ce cas, le caractère résistant – c'est-à-dire l'augmentation des CMI – pour ces bactéries à croissance lente n'apparaît pas obligatoirement en 24 heures (Buu-Hoï, 1985). Pour les streptocoques et l'érythromycine, l'azithromycine, la spiramycine, la josamycine, la tylosine, la lincomycine et la clindamycine, les seuls résultats rapportés sont ceux de la lecture à 48 heures car les valeurs des CMI pour les souches du contrôle de qualité et ces sept antibiotiques étaient stables entre 24 et 48 heures.

La présence ou non d'une culture bactérienne visible à l'œil nu est repérée au niveau de chaque dépôt sur la boîte témoin sans antibiotique et sur chaque boîte contenant l'antibiotique.

La lecture débute par les boîtes témoins afin de contrôler la croissance bactérienne. La CMI pour chacune des souches est la plus faible concentration pour laquelle aucune culture n'est visible à l'œil nu ; la présence d'une ou deux colonies ou d'une croissance très fine à l'emplacement d'un dépôt n'est pas prise en considération.

7) Contrôle de qualité

La validation des résultats a été réalisée en se référant aux valeurs fournies par le CA-SFM (1996) ou par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2001 et 2002) (Tableau XX).

Tableau XX : Résultats du contrôle de qualité pour la mesure des CMI (en mg/L).

Les valeurs attendues (en mg/L) sont mentionnées en italiques ainsi que le comité les fournissant.

Molécules	Comité	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 *ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
Erythromycine	<i>NCCLS M100-S11</i> <i>CA-SFM</i>	<i>*0,25 – 1</i> <i>0,12 – 0,5</i> 0,25 – 0,5	<i>1 – 4</i> <i>0,5 – 4</i> 1
Azithromycine	<i>NCCLS M100-S11</i>	<i>*0,5 – 2</i> 0,5	<i>ND</i> 8
Tylosine	<i>NCCLS M31-A2</i>	<i>*0,5 – 4</i> 1	<i>0,5 – 4</i> 1
Lincomycine	<i>CA-SFM</i>	<i>0,5 – 2</i> 1	<i>16 – 64</i> 32
Clindamycine	<i>NCCLS M100-S11</i> <i>CA-SFM</i>	<i>*0,06 – 0,25</i> <i>0,06 – 0,25</i> 0,12	<i>4 – 16</i> <i>4 – 16</i> ND

ND : Non Déterminé

Le contrôle de qualité n'est pas défini pour la spiramycine, la josamycine et la pristinamycine. Les valeurs trouvées pour les souches de référence sont rapportées dans le tableau XXI ainsi que les valeurs des CMI pour des souches de *S. aureus* ou d'*Enterococcus faecalis* d'origine humaine (Bryskier et Bergogne-Bérézin, 1999).

Tableau XXI : Résultats du contrôle de qualité pour la mesure des CMI.

Les valeurs rapportées par Bryskier et Bergogne-Bérézin (1999) sont mentionnées en italiques (en mg/L).

Molécules	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
Spiramycine	<i>0,5 – 1</i> 4 – 8	<i>1</i> 1 – 2
Josamycine	<i>0,25 – 2</i> ≈ 2000 U/L	<i>2 – 8</i> ≈ 2000 – 4000 U/L
Pristinamycine	<i>0,12</i> 0.12 – 0.25	<i>ND</i> 1 – 2

8) Interprétation : catégorisation clinique

La catégorisation clinique – Sensible, Intermédiaire, Résistant - a été faite en utilisant les concentrations critiques fournies par le CA-SFM (2004) ou le NCCLS (2001) (Tableau XXII).

Les concentrations critiques ne sont pas définies pour la josamycine et la tylosine. Le caractère « résistant » d'un isolat – au sens bactériologique du terme – peut être évalué par observation de la distribution des valeurs des CMI pour un grand nombre de souches.

Cependant, il faut garder à l'esprit que la catégorisation clinique s'applique uniquement « aux traitements par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit » et ne concerne pas les traitements par voie locale.

Tableau XXII : Concentrations critiques (en mg/L) utilisées pour la catégorisation clinique.

Antibiotique	Comité	Concentrations critiques		Commentaires
		c	C	
Erythromycine	CA-SFM	≤1	>4	
	NCCLS M100-S11	≤0,5	>4	défini pour les staphylocoques
	NCCLS M100-S11	≤0,25	>0,5	défini pour les streptocoques
Azithromycine	CA-SFM	≤0,5	>4	
	NCCLS M100-S11	≤2	>4	défini pour les staphylocoques
		≤0,5	>1	défini pour les streptocoques autres que <i>S. pneumoniae</i>
Spiramycine	CA-SFM	≤1	>4	défini pour les staphylocoques
Lincomycine	CA-SFM	≤2	>8	
Clindamycine	CA-SFM	≤2	>2	
	NCCLS M100-S11	≤0,25 ≤0,25	>0,5 >2	streptocoques Staphylocoques
Pristinamycine	CA-SFM	≤1	>2	

D. Antibiogrammes par diffusion : technique des disques

La technique des disques consiste à placer, à la surface d'un milieu uniformément ensemencé avec une souche, des disques de papier buvard imprégnés chacun d'une quantité donnée d'antibiotique. L'antibiotique diffuse alors autour du disque avec un gradient de concentration inversement proportionnel au carré de la distance au disque. Après incubation une zone d'inhibition de la croissance est observée autour du disque. Plus la souche étudiée est sensible à l'antibiotique plus le diamètre de la zone d'inhibition est élevé. Ce diamètre est donc mesuré et permet de catégoriser la souche.

Les antibiogrammes par diffusion ont été réalisés selon le standard du CA-SFM (1996).

1) Antibiotiques

Les charges et l'origine des disques utilisés sont mentionnées dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII : **Disques utilisés (charges et origine) pour la technique des disques.**

Erythromycine	bioMérieux	15 UI
Spiramycine	bioMérieux	100 µg
	Bio-Rad	100µg
Lincomycine	Bio-Rad	15 µg
Pristinamycine	Bio-Rad	15 µg

2) Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé était la gélose de Mueller-Hinton pour les staphylocoques, et le même milieu supplémenté par 5 % de sang de mouton défibriné pour les streptocoques. Des géloses prêtes à l'emploi (bioMérieux) ont été utilisées.

3) Inoculum

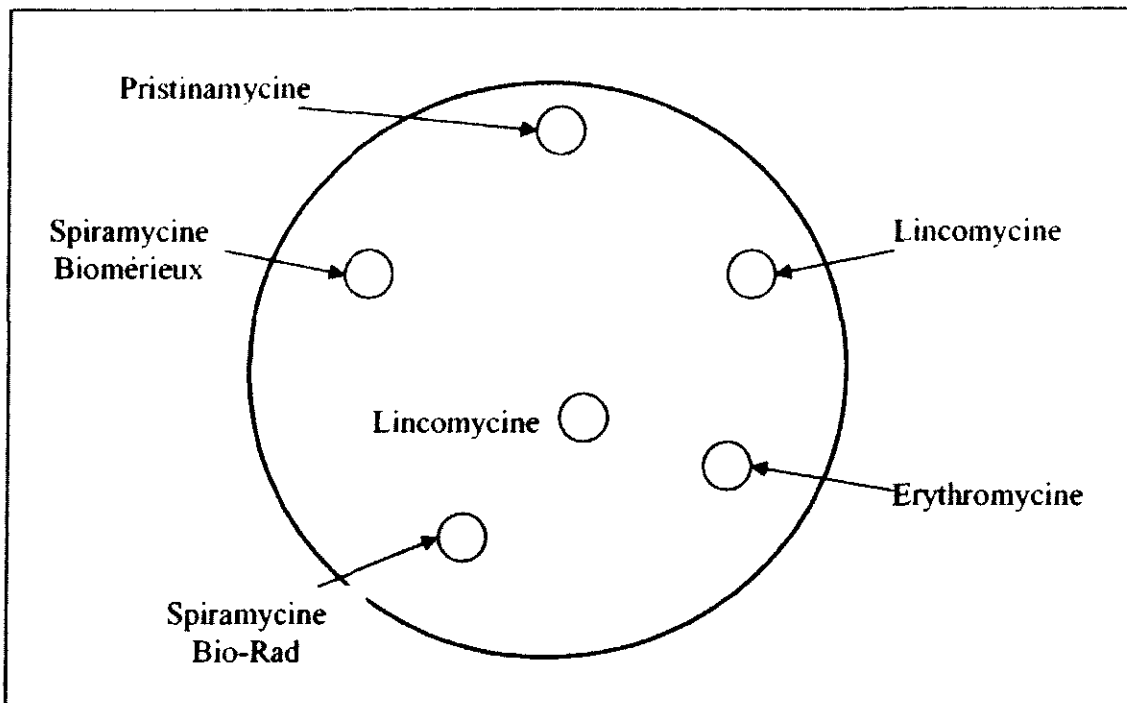
L'inoculum a été préparé à partir de bactéries en phase stationnaire de croissance. Chaque souche a été mise en suspension dans du tampon PBS (Sigma-Aldrich) de pH=7. La suspension finale avait une concentration de 10^6 UFC/mL pour les staphylocoques et de 10^7 UFC/mL pour les streptocoques.

4) Ensemencement et dépôt des disques

Après un séchage de 30 minutes à 37 °C, les milieux ont été ensemencés par écouvillonnage et les disques ont été déposés 3 cm centre à centre.

Pour les streptocoques, la caractérisation des phénotypes MLS_B inductible ou constitutif a été faite en déposant un disque supplémentaire de lincomycine 15 mm bord à bord des disques d'érythromycine et de spiramycine (Bio-Rad) (Figure 5).

Figure 5. Schéma de la disposition des disques pour l'évaluation de la sensibilité des streptocoques aux macrolides et apparentés par la technique de diffusion.



5) Incubation

L'incubation a été faite à 35 ± 1 °C en présence d'air, y compris pour les streptocoques.

6) Lecture

La lecture des diamètres a été faite après 18 heures d'incubation pour les staphylocoques, et après 24 heures pour les streptocoques.

Les résultats sont obtenus en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque d'antibiotique pour chaque souche. Si aucune zone d'inhibition n'est observée autour d'un disque, le diamètre mesuré est alors celui du disque soit 6 mm.

7) Contrôle de qualité

Les résultats du contrôle de qualité sont mentionnés dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV : Résultats du contrôle de qualité pour les antibiogrammes par la technique des disques (valeurs en mm).

Les valeurs attendues sont mentionnées en italiques.

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
Erythromycine	<i>27 - 31 (MH)</i>	<i>19 - 26,5 (MH)</i>
MH	30	22
MH + sang	30, 32	20, 21
Spiramycine Bio-Rad	<i>25 - 27 (MH)</i>	<i>ND</i>
MH	22	
MH + sang	24, 25	
Spiramycine bioMérieux	<i>25 - 27 (MH)</i>	<i>ND</i>
MH	18,5	
MH + sang	19,5, 20	
Lincomycine	<i>25 - 30</i>	<i>9 - 13</i>
MH	29	10
MH + sang	30, 32	7, 9,5
Pristinamycine	<i>26 - 31,5</i>	<i>20 - 28</i>
MH	31	28,5
MH + sang	30, 31	22, 24

8) Catégorisation clinique

La catégorisation clinique a été faite en utilisant les diamètres critiques fournis par le CA-SFM (2004) (Tableau XXV).

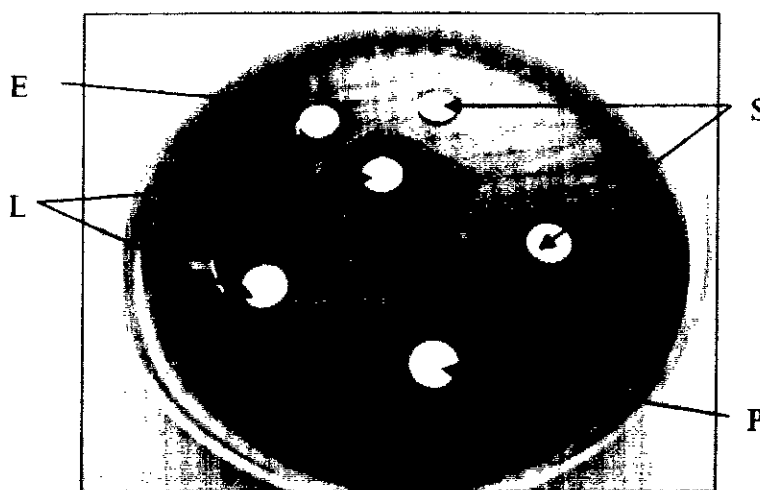
Tableau XXV . Diamètres critiques (en mm) utilisés pour la catégorisation clinique.

Antibiotique	Diamètres critiques		Commentaires
	d	D	
Erythromycine 15 UI	<17	≥22	
Spiramycine 100 µg	<19	≥24	Pour les staphylocoques
Lincomycine 15 µg	<17	≥21	
Pristinamycine 15 µg	<19	≥22	

Pour les streptocoques, les souches résistantes à l'érythromycine et à la lincomycine ont été assignées au phénotype MLS_B constitutif. Le phénotype MLS_B inductible a été attribué aux souches résistantes à l'érythromycine qui présentaient une diminution du rayon de la zone d'inhibition autour du disque de lincomycine en présence d'érythromycine (image d'antagonisme érythromycine – lincomycine) (Figure 6).

Figure 6 : Phénotype MLS_B inductible chez une souche de *Streptococcus uberis*.

E : érythromycine ; S : spiramycine ; L : lincomycine ; P : pristinamycine.



E. Caractérisation d'un mécanisme d'efflux d'un antibiotique

1) Souches bactériennes

L'étude a porté sur 19 souches de *S. uberis* :

- sept souches étaient sensibles à la spiramycine (CMI = 0,25-0,5 mg/L) dont une de CMI de lincomycine élevée (2 mg/L) ;

- 11 souches étaient résistantes à bas niveau à la spiramycine (CMI = 4-8 mg/L) dont 3 de CMI de lincomycine élevée (2 mg/L) ;

- 1 souche présentait une résistance de haut niveau à la spiramycine (CMI = 264 mg/L) (phénotype MLS_B inductible).

La souche de référence *S. aureus* ATCC 25923 a été incluse pour chaque mesure de CMI.

2) Antibiotiques

Les antibiotiques retenus étaient la spiramycine (Merial) et la lincomycine (Pharmacia) (Tableau XIX). La gamme des concentrations testées s'étendait de 0,015 à 32 mg/L.

3) Inhibiteurs de pompes d'efflux

La réserpine (Sigma-Aldrich) (Brenwald *et al.*, 1998) et le PANA (Phe-Arg β-naphthylamide dihydrochloride) (Sigma-Aldrich) (Escribano *et al.*, 2004) ont été utilisés comme inhibiteurs de pompes d'efflux. La solution-mère de réserpine a été préparée en acide acétique glacial puis diluée dans de l'eau.

4) Mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices

Les CMI ont été déterminées par la technique de référence de dilution en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM (1996) (*cf.* paragraphe II.C.).

Pour la spiramycine, les CMI ont été déterminées en présence de réserpine à des concentrations dans les boîtes de Petri égales à 10 mg/L et 5 mg/L, et en présence de PANA à une concentrations finale de 20 mg/L.

Pour la lincomycine, les CMI ont été déterminées en présence de réserpine à des concentrations dans les boîtes de Petri égales à 10 mg/L.

Pour les mesures de CMI en présence d'inhibiteur, chaque boîte de Petri contenait : 17 mL de gélose de Mueller-Hinton, 1 mL d'antibiotique, 1 mL de sang défibriné de mouton et 1 mL d'inhibiteur. Des témoins « inhibiteurs » ont été réalisés (17 mL de gélose + 1 mL d'eau +

1 mL d'inhibiteur + 1 mL de sang) pour vérifier la croissance des souches étudiées en présence de reserpine ou de PANA.

F. Caractérisation d'un mécanisme d'inactivation d'un antibiotique : Test de satellitisme de Gots.

Le test de satellitisme de Gots (Anonyme, 1985) permet de caractériser la production par une souche bactérienne d'une enzyme inactivatrice d'un antibiotique

Si l'on cultive une souche productrice d'une enzyme inactivatrice sur une gélose ensemencée avec une souche indicatrice sensible à cet antibiotique et contenant une quantité d'antibiotique juste suffisante pour inhiber cette dernière, la production d'enzyme provoquera une dégradation de l'antibiotique dans le milieu de culture qui se traduira par la croissance de la souche indicatrice autour de la souche productrice. Cette technique est utilisable pour mettre en évidence les bêta-lactamases, les enzymes inactivant les macrolides et apparentés et les chloramphénicol-acétyltransférases.

1) Souches bactériennes

Pour la bonne réalisation de cette technique, il faut disposer d'un témoin négatif qui sera au mieux un dérivé sensible de la souche sauvage étudiée, obtenu par exemple par cure plasmidique, ou une souche de la même espèce résistante par un mécanisme autre que l'inactivation ou encore une souche sensible. Le témoin positif consiste en une souche possédant effectivement le mécanisme de résistance recherché.

Neuf souches de *Streptococcus uberis* ont été utilisées (Tableau XXVI) :

- une souche sensible correspondant au témoin négatif ;
- une souche résistante de phénotype MLS_B (témoin a priori négatif) ;
- trois souches résistantes à bas niveau à la spiramycine et à la lincomycine ;
- trois souches résistantes à bas niveau à la spiramycine ;
- une souche résistante à bas niveau à la lincomycine.

Tableau XXVI. Caractéristiques des neuf souches de *Streptococcus uberis* utilisées.

N° souche	CMI (en mg/L)		Catégorisation clinique		Commentaire
	Spira	Linco	Spira	Linco	
55	0,5	0,12	S		Témoin négatif
63	>128	>128	MLS _B		Témoin négatif
67	4	2	I	S	R BN Sp, L
70	8	0,12	R	S	R BN Sp et S L
76	8	0,12	R	S	R BN Sp et S L
77	4	2	I	S	R BN Sp, L
85	8	0,06	R	S	R BN Sp et S L
88	0,5	2	S	S	S Sp et R BN L
92	4	2	I	S	R BN Sp, L

R BN : Résistance Bas Niveau ; S : Sensible ; Sp : Spiramycine ; L : Lincomycine

La souche *Micrococcus luteus* ATCC 9341 a été utilisée comme souche indicatrice.

2) Antibiotiques

Les antibiotiques étudiés étaient la lincomycine (Pharmacia) et la spiramycine (Merial) (Tableau XIX). La concentration finale de lincomycine utilisée pour le test de Gots était de 0,1 mg/L et celle de la spiramycine de 2 mg/L.

3) Milieu de culture

Le milieu de culture retenu était une gélose de Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton défibriné (bioMérieux).

4) Technique

À partir d'une culture de 48 heures à 30 °C de *Micrococcus luteus* ATCC 9341, une suspension en tampon PBS contenant environ 10⁷ bactéries par mL est préparée.

Dans une boîte de Petri, sont ajoutés successivement :

- 17 mL de Mueller-Hinton en surfusion ;
- 1 mL de la suspension de *M. luteus* ;

- 1 mL de la solution de spiramycine ou de lincomycine ,
- 1 mL de sang défibriné de mouton

Après solidification, la boîte est séchée à l'étuve puis le milieu est ensemencé avec les souches de streptocoques à tester et les souches témoins sous forme d'un anneau à l'aide d'une anse chargée d'une culture prélevée sur milieu solide.

Les boîtes sont mises à incuber à 30 °C et la lecture est faite à 48 heures.

II. Résultats

A. *Staphylococcus aureus*

Les mesures des CMI d'érythromycine et de lincomycine ont été validées par le contrôle de qualité (Tableau XX).

Quarante-trois souches de *S. aureus* étaient sensibles à l'érythromycine (CMI = 0,12-0,5 mg/L) et quatre souches résistantes (CMI > 128 mg/L) (Figure 7). Les 43 souches sensibles étaient aussi sensibles à la lincomycine (CMI = 1-2 mg/L) (Figure 8). Ces souches avaient des CMI basses et homogènes de josamycine comprises entre 500 et 2000 U/L (Figure 9). Deux des souches résistantes à l'érythromycine étaient résistantes à la lincomycine (CMI > 128 mg/L), avaient des CMI de josamycine très élevées et étaient sensibles à la pristinamycine (Figure 10) ; ces souches présentaient un phénotype MLS_B constitutif. Les deux autres souches résistantes à l'érythromycine étaient sensibles à la lincomycine, avaient des CMI basses de josamycine et étaient sensibles à la pristinamycine. Un antagonisme entre l'érythromycine et la lincomycine a été observé par la technique des disques ; ces souches étaient donc de phénotype MLS_B inductible (Tableau XXVII).

Figure 7 : Histogramme de la distribution des CMI d'érythromycine pour 47 souches de *Staphylococcus aureus*.

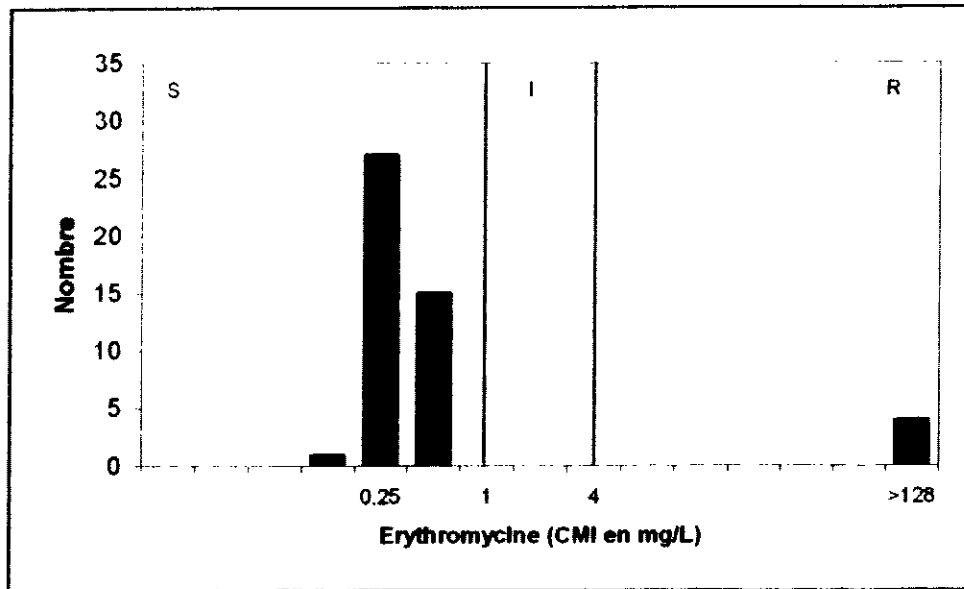


Figure 8 : Histogramme de la distribution des CMI de lincomycine pour 47 souches de *Staphylococcus aureus*.

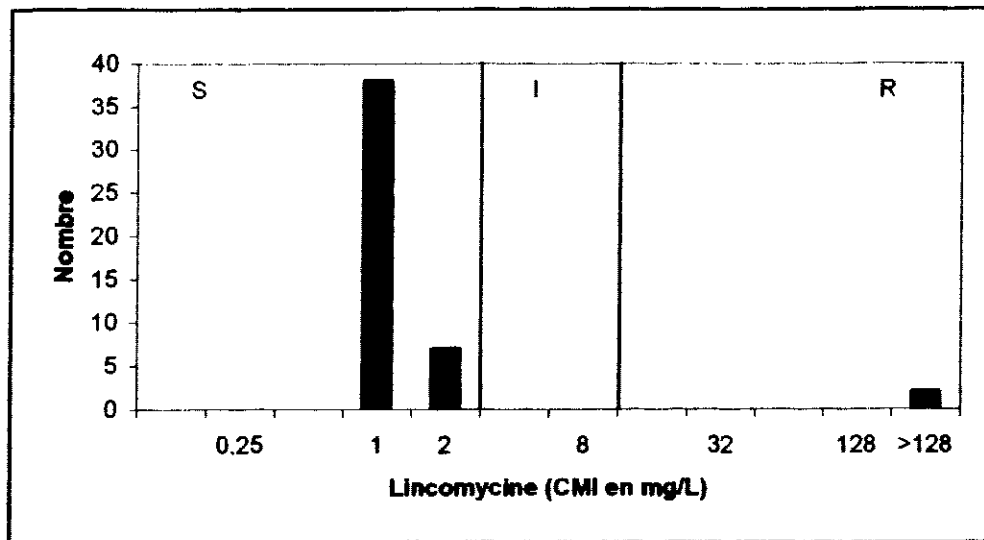


Figure 9 : Histogramme de la distribution des CMI de josamycine pour 47 souches de *Staphylococcus aureus*.

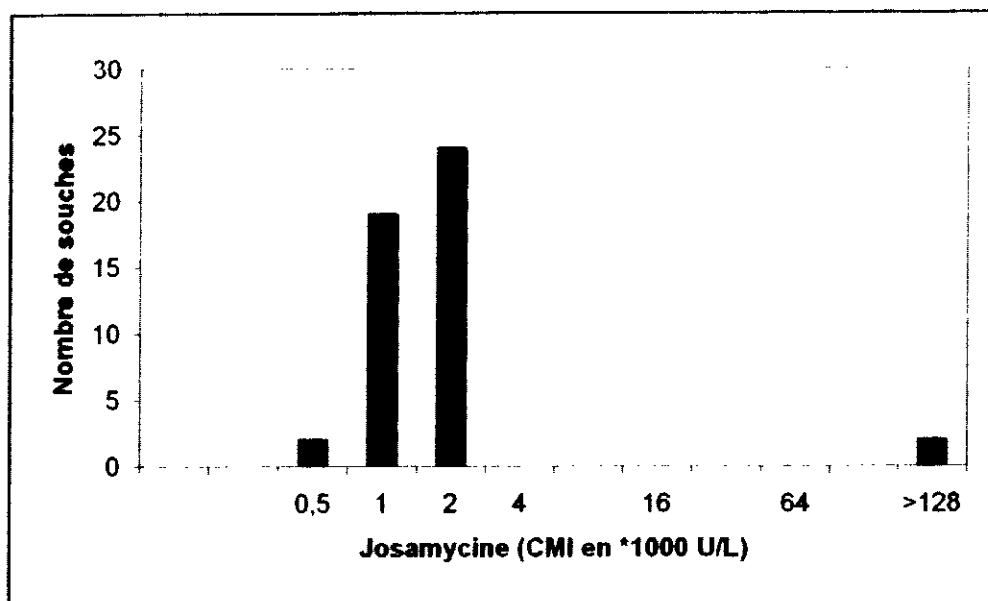


Figure 10 : Histogramme de la distribution des CMI de pristinamycine pour 47 souches de *Staphylococcus aureus*.

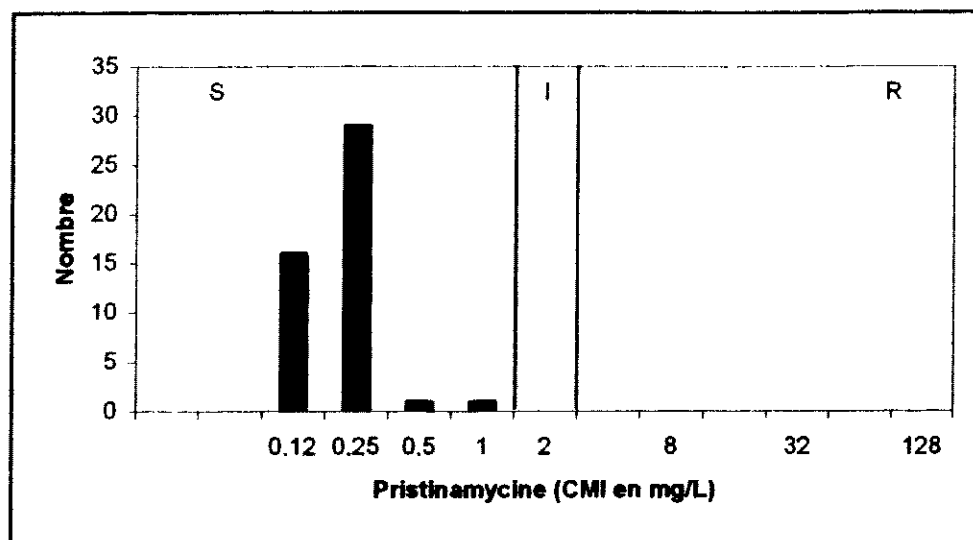


Tableau XXVII : Profils de résistance aux macrolides et apparentés pour 47 souches sauvages de *Staphylococcus aureus* isolées de mammites cliniques chez la vache.

Nombre de souches	Erythromycine Macrolide C14	Josamycine Macrolide C16	Lincomycine Lincosamide	Pristinamycine Synergistine	Phénotype

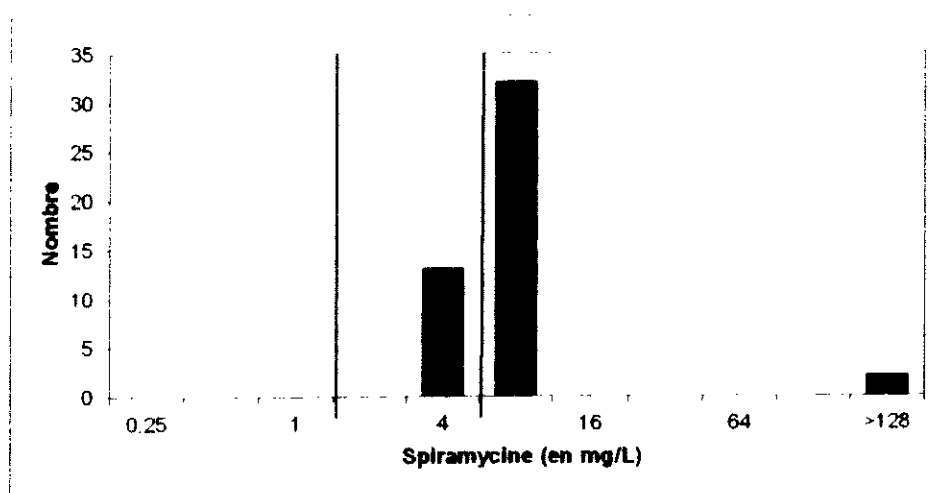
S : sensible , R : résistant

Bien que 43 souches soient phénotypiquement sensibles aux macrolides, aucune souche n'était sensible à la spiramycine, 13 intermédiaires et 34 résistantes si les deux concentrations discriminantes du CA-SFM sont utilisées pour la catégorisation clinique.

La distribution des CMI de spiramycine était nettement bimodale avec 45 souches de CMI égales à 4-8 mg/L et deux souches de CMI très élevées (CMI > 512 mg/L). Les souches catégorisées résistantes à la spiramycine appartiennent donc à deux populations distinctes, une intermédiaire/résistante et une résistante à haut niveau (Figure 11). Les deux souches de CMI > 128 mg/L étaient les deux souches de phénotype MLS_B constitutif. Les 45 autres souches correspondaient, d'une part aux deux souches de phénotype MLS_B inductible et, d'autre part aux 43 souches sensibles à l'érythromycine, à la josamycine, à la lincomycine et à la pristinamycine. La souche *S. aureus* ATCC 25923 du contrôle de qualité, qui est réputée sensible aux macrolides et apparentés, avait une CMI de spiramycine égale à 4-8 mg/L. Les souches de *S. aureus* de phénotype sauvage ont donc dans notre étude, des CMI de spiramycine égale à 4-8 mg/L.

Les CMI de spiramycine pour 19 souches sauvages et les deux souches du contrôle de qualité ont été mesurées une deuxième fois en utilisant une poudre titrée fournie par Merial, dont la stabilité dans le temps avait été vérifiée. Pour 16 souches, les mêmes valeurs de CMI ont été retrouvées ; pour trois souches, elles étaient supérieures d'une dilution.

Figure 11 : Histogramme de la distribution des CMI de la spiramycine pour 47 souches de *Staphylococcus aureus*.



Les résultats des antibiogrammes par la technique des disques ont été validés pour l'érythromycine, la lincomycine et la pristinamycine (Tableau XXIV)

Les résultats, S, I ou R, des antibiogrammes par diffusion pour les staphylocoques et l'érythromycine, la lincomycine et la pristinamycine (Figure 12) étaient en parfaite concordance avec ceux obtenus par la mesure des valeurs de CMI. Aucune erreur⁷ n'a été observée. Deux souches présentaient un phénotype MLS_B constitutif et deux un phénotype MLS_B inducible (antagonisme entre d'une part la lincomycine et d'autre part l'érythromycine et la spiramycine). Les valeurs des diamètres pour les souches sensibles sont rapportées dans le tableau XXVIII ; les souches résistantes à la lincomycine et/ou l'érythromycine poussaient au contact du disque (diamètre égal à 6 mm).

Le contrôle de qualité n'était pas conforme pour les disques de spiramycine avec des valeurs de diamètres inférieures aux valeurs attendues, notamment pour les disques bioMérieux. Seuls les résultats obtenus avec les disques de marque Bio-Rad ont été pris en compte (Tableau XXIV).

Selon les résultats de l'antibiogramme par diffusion et en utilisant les critères de catégorisation clinique du CA-SFM, 6,4 % des souches étaient sensibles à la spiramycine, 89,4 % intermédiaires et 4,3 % résistantes (Figure 12). L'analyse de la distribution des

⁷ Erreur très majeure = souche classée R par la mesure des CMI et S par l'antibiogramme par diffusion ; erreur majeure = souches classées S par la mesure des CMI et R par l'antibiogramme par diffusion ; erreur mineure = souche classée I par une technique et S ou R par une autre technique.

diamètres met en évidence deux populations, une majoritaire de diamètres diminués et une minoritaire (deux souches sur 47) résistante poussant au contact du disque.

De nombreuses discordances ont été observées entre CMI et technique de diffusion pour la spiramycine, avec 74,5 % d'erreurs mineures dont 32 souches sur 47 (68,0 %) classées R d'après les CMI et I d'après la technique de diffusion. Cependant, les deux populations de souches observées avec la technique des disques pour la spiramycine correspondent exactement aux populations qualifiées de S et R, au sens bactériologique du terme, par la mesure des CMI.

Figure 12 : Histogrammes de la distribution des diamètres des zones d'inhibition (en mm) pour 47 souches de *Staphylococcus aureus* et quatre macrolides et apparentés.

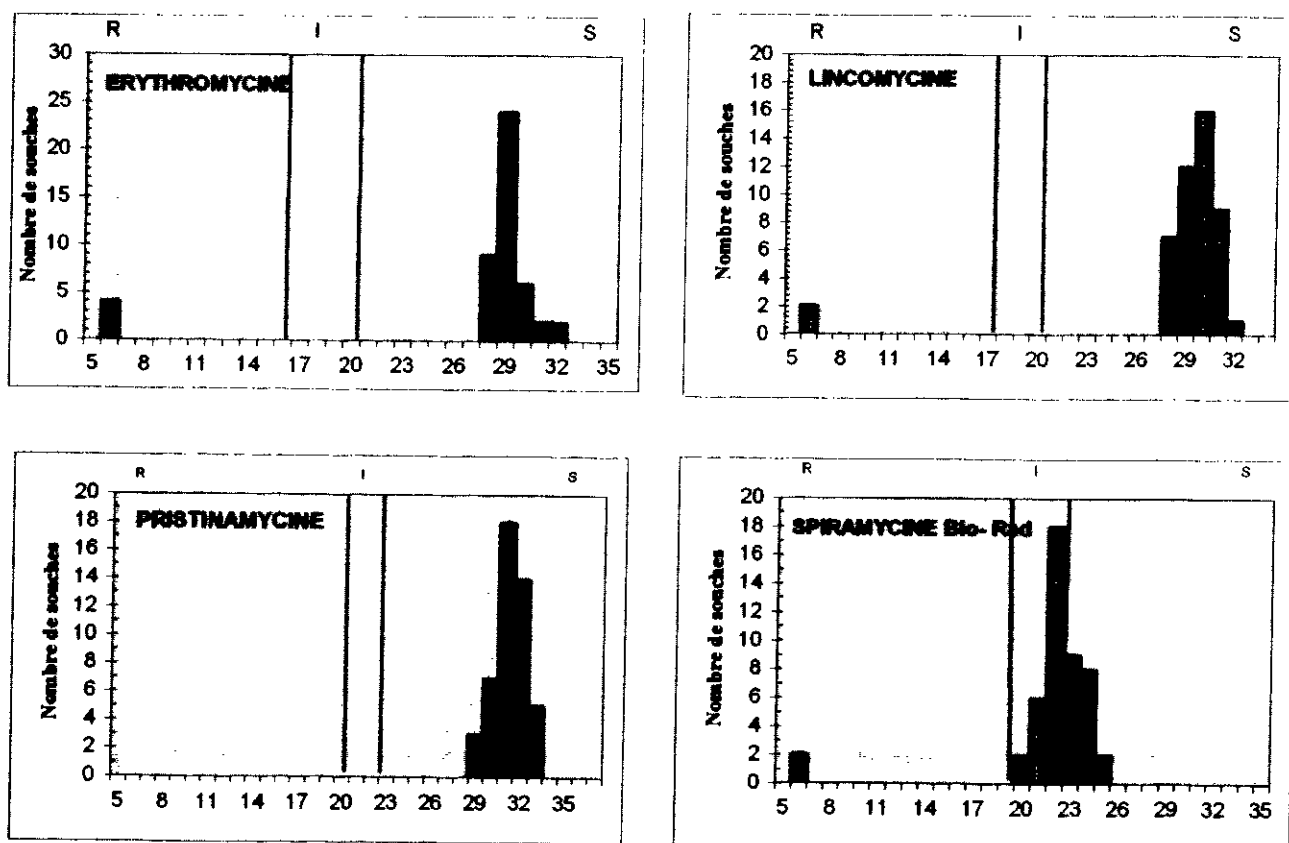


Tableau XXVIII . Antibiogrammes par la technique des disques pour 47 souches de *Staphylococcus aureus* : valeurs des diamètres pour les souches sensibles.

	Erythromycine	Lincomycine	Pristinamycine	Spiramycine
N	43	45	47	45
Moyenne (mm)*	29,0 ± 0,3	29,6 ± 0,3	31,2 ± 0,3	22,3 ± 0,3
Diamètre minimum (mm)	27,5	28	29	20
Diamètre maximum (mm)	32	32	33	25
Modale	29	30	31	22
Médiane	29	30	31	22

* au risque $\alpha = 5 \%$.

B. Streptocoques

Trois souches de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* présentaient un phénotype sensible :

* CMI d'érythromycine = 0,03-0,06 mg/L,

* CMI de spiramycine = 0,5 mg/L,

* CMI de josamycine = 0,12-0,25 mg/L,

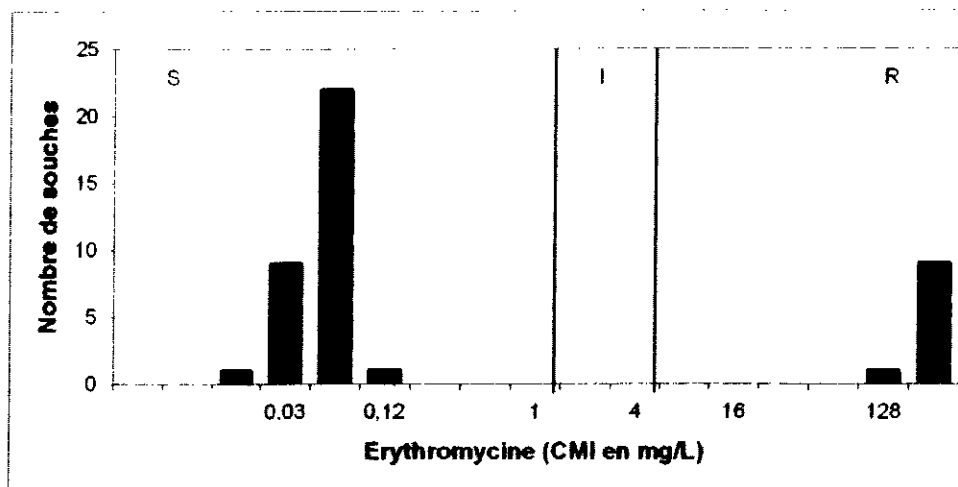
* CMI de lincomycine = 0,12-0,25 mg/L,

* CMI de pristinamycine = 0,03-0,06 mg/L,

et une, un phénotype MLS_B constitutif.

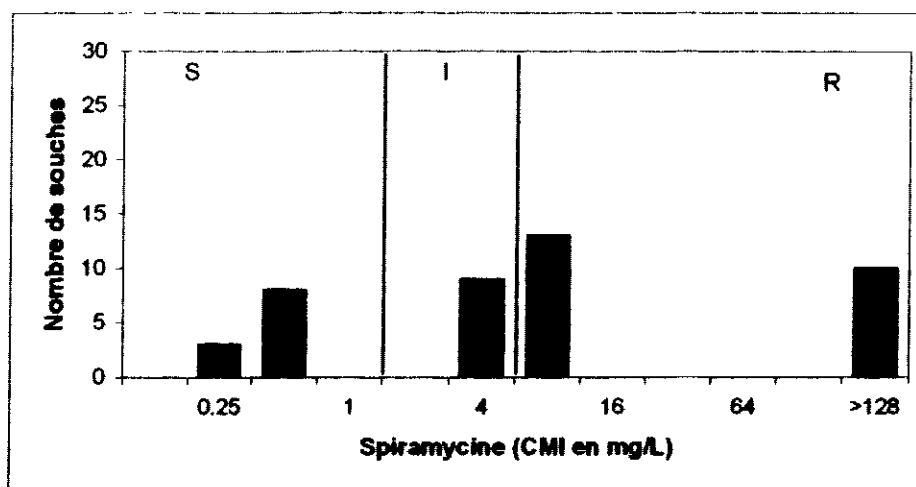
1) Profils de résistance aux macrolides et apparentés des souches de *S. uberis*

Figure 13 : Histogramme de la distribution des CMI d'érythromycine pour 43 souches de *Streptococcus uberis*.



Trente-trois souches de streptocoques étaient sensibles à l'érythromycine (CMI = 0,015-0,12 mg/L), et dix souches résistantes (CMI \geq 128 mg/L) (Figure 13).

Figure 14: Histogramme de la distribution des CMI de spiramycine pour 43 souches de *Streptococcus uberis*.

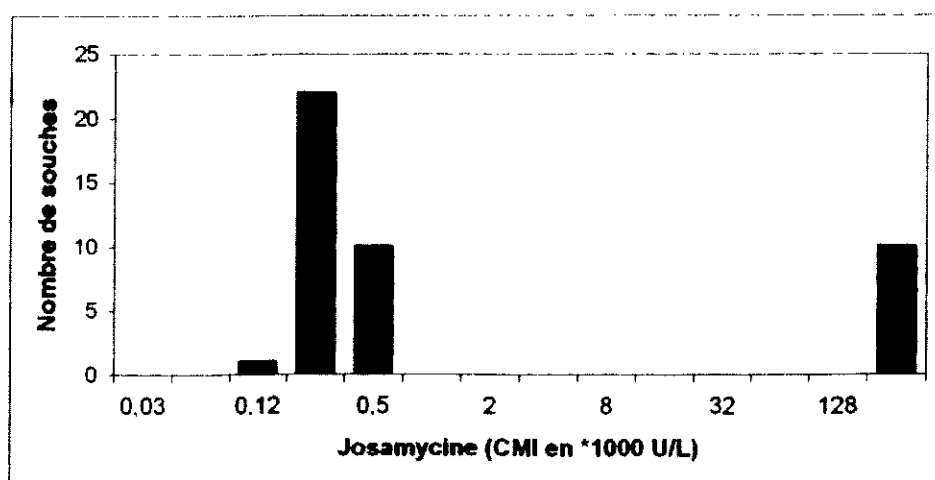


La distribution des CMI de spiramycine pour les 43 souches de *S. uberis* testées était nettement trimodale avec une population sensible (11 souches sur 43) de CMI basses égales à 0,25-0,5 mg/L, une population majoritaire (22/43) résistante à bas niveau - au sens

bactériologique - de CMI égales à 4-8 mg/L et 10 souches résistantes à haut niveau (CMI > 512 mg/L) (Figure 14).

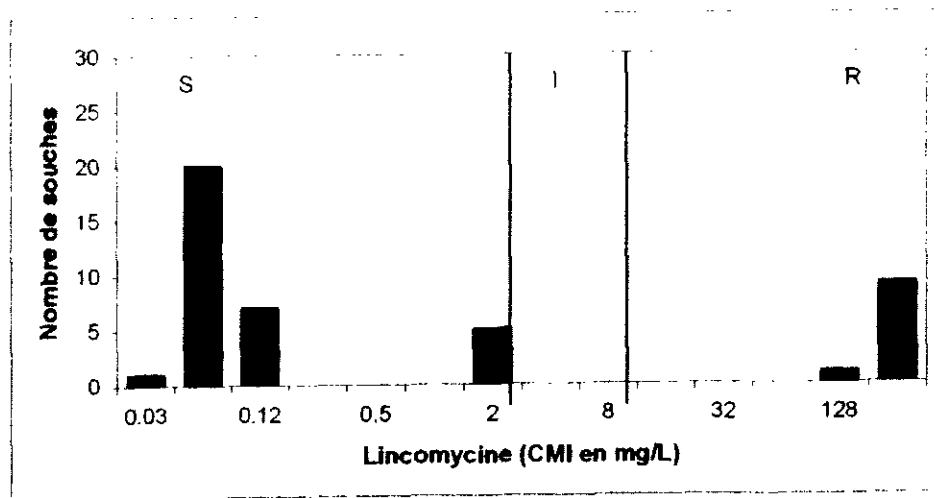
Si les deux concentrations discriminantes du CA-SFM sont utilisées pour la catégorisation clinique, 11 souches étaient sensibles à la spiramycine, 9 intermédiaires et 23 résistantes.

Figure 15 : Histogramme de la distribution des CMI de josamycine pour 43 souches de *Streptococcus uberis*.



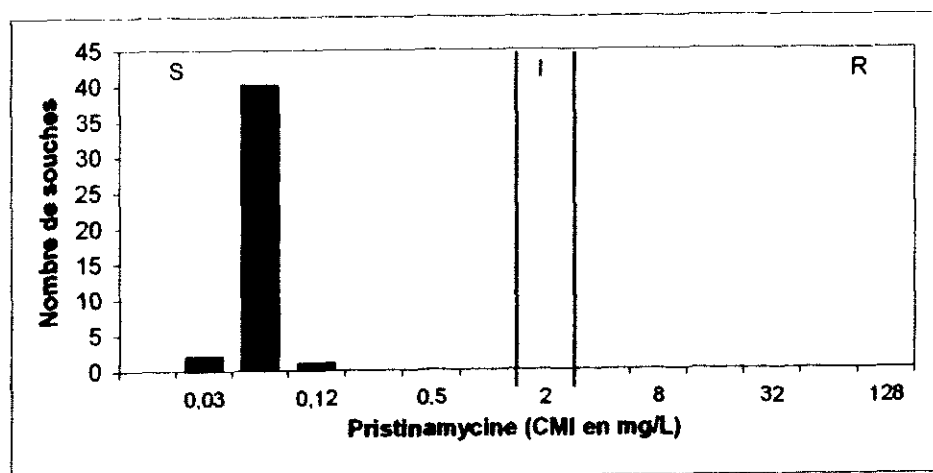
La distribution des CMI de josamycine était nettement bimodale avec une population de souches sensibles au sens bactériologique du terme (33 souches sur 43) de CMI égales à 120-500 U/L et une population de souches résistantes (10/43) (CMI > 128 000 U/L) (Figure 15).

Figure 16 : Histogramme de la distribution des CMI de lincomycine pour 43 souches de *Streptococcus uberis*.



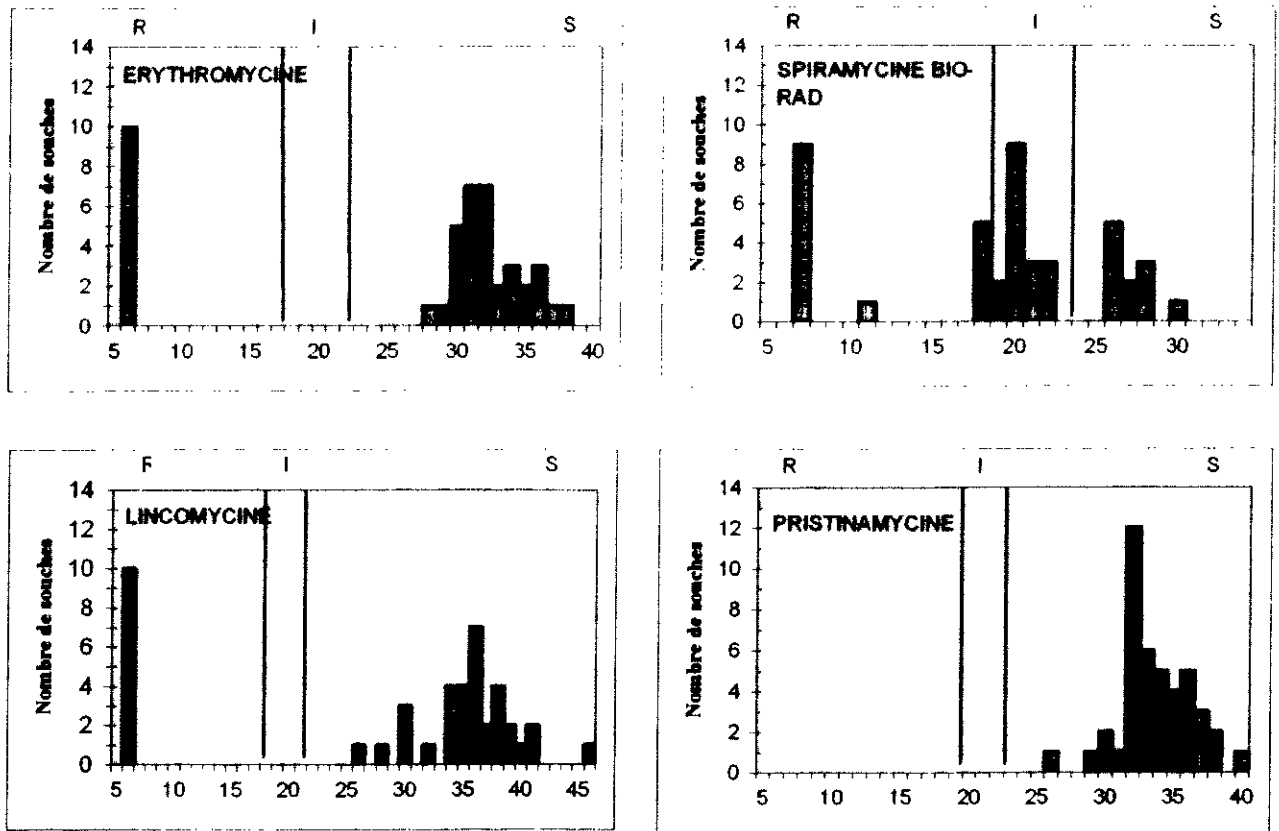
Trente-trois souches de *S. uberis* étaient sensibles à la lincomycine, et 10 souches résistantes (CMI \geq 128 mg/L) (Figure 16). Parmi les souches classées S, cinq souches de *S. uberis* (15,1 % des souches sensibles) avaient une sensibilité diminuée pour la lincomycine (CMI = 2 mg/L).

Figure 17 : Histogramme de la distribution des CMI de pristinamycine pour 43 souches de *Streptococcus uberis*.



La distribution des CMI de pristinamycine était unimodale (CMI = 0,03-0,12 mg/L) avec 100 % des souches sensibles (Figure 17).

Figure 18 Histogrammes de la distribution des diamètres des zones d'inhibition (en mm) pour 43 souches de *Streptococcus uberis*.



Les résultats, S ou R, des antibiogrammes par la technique des disques pour *S. uberis* et l'érythromycine, la lincomycine et la pristinamycine (Figure 18) étaient en parfaite concordance avec ceux obtenus par la mesure des valeurs des CMI. Aucune erreur n'a été observée. Les valeurs des diamètres pour les souches sensibles sont rapportées dans le tableau XXIX ; pour la lincomycine, les cinq souches de sensibilité diminuée n'ont pas été incluses car elles formaient une population séparée de diamètres compris entre 26 et 30 mm. Les souches résistantes à la lincomycine ou à l'érythromycine poussaient au contact du disque (diamètre égal à 6 mm).

Tableau XXIX : Antibiogrammes par la technique des disques pour 43 souches de *Streptococcus uberis* : valeurs des diamètres pour les souches sensibles.

	Erythromycine	Lincomycine	Pristinamycine
N	33	28	33
Moyenne (mm)*	32,3 ± 0,4	36,8 ± 0,5	33,5 ± 0,5
Diamètre minimum (mm)	28	32	26
Diamètre maximum (mm)	38	46	40
Modale	32	36	32
Médiane	32	36	33

* au risque $\alpha = 5\%$

Pour la spiramycine, seuls les résultats obtenus avec les disques de marque Bio-Rad ont été pris en compte. Selon les résultats de l'antibiogramme par diffusion et en utilisant les critères de catégorisation clinique du CA-SFM (2004), 25,6 % des souches étaient sensibles à la spiramycine, 34,9 % intermédiaires et 39,5 % résistantes (Figure 18). L'analyse de la distribution des diamètres des zones d'inhibition (Figure 18) met en évidence trois populations, une sensible (n=11, diamètres compris entre 26 et 30 mm, moyenne = 26,7 mm), une résistante (n=10, diamètres compris entre 6 et 11 mm) et une de sensibilité diminuée majoritaire (n=22, diamètres compris entre 18 et 22 mm). Ces trois populations correspondaient exactement aux populations qualifiées de S, R à haut niveau et R à bas niveau, au sens bactériologique du terme, par la mesure des CMI.

Ainsi, la technique des disques ne serait pas à remettre en cause pour évaluer la sensibilité des souches de *Streptococcus uberis* à la spiramycine. Les 17,0 % d'erreurs mineures observées entre les résultats obtenus par la technique de référence de dilution en milieu gélosé et par la technique des disques, la catégorisation clinique ayant été faite en utilisant les valeurs de c et C, d et D fournies par le CA-SFM, sont liées au fait que C et d séparent arbitrairement la population homogène de « CMI augmentées » en deux (souches de CMI égales à 8 mg/L classées I par la technique des disques).

Les profils de résistance aux macrolides et apparentés observés chez *S. uberis* sont répertoriés dans le tableau XXX. Pour l'établir, il a été tenu compte uniquement des caractères sensible, résistante à bas niveau, résistante à haut niveau au sens bactériologique du terme et non de la catégorisation clinique.

Tableau XXX : Profils de résistance aux macrolides et apparentés de 43 souches sauvages de *Streptococcus uberis* isolées de mammites cliniques chez la vache.

Nombre de souches	Erythromycine Macrolide C14	Spiramycine Macrolide C16	Josamycine Macrolide C16	Lincomycine Lincosamide	Pristinamycine Synergistine A	Phenotype
1	S	S	S	S	S	Sauvage
1	S	S	S	S	S	
1	S	S	S	S	S	
1	S	S	S	S	S	
1	S	S	S	S	S	

S : sensible ; R : résistant ; / : R de bas niveau

Toutes les souches MLS_B étaient de phénotype MLS_B inductible, comme cela a été déterminé par la technique de diffusion. Neuf souches étaient de phénotype sauvage et dix de phénotype MLS_B inductible. Vingt-quatre souches présentaient un profil de résistance – résistance isolée à la spiramycine et/ou à la lincomycine – qui ne pouvait être rapporté à un mécanisme de résistance reconnu et fréquent.

2) Etude des souches de *S. uberis* de phénotype « résistance de bas niveau » à la spiramycine

Des souches de *S. uberis* « modérément sensibles » à la spiramycine dont les CMI sont égales à 4 ou 8 mg/L ont été observées. Leur proportion élevée dans notre étude s'explique par le mode de recrutement des isolats.

Les valeurs des CMI de spiramycine ont été contrôlées en les redéterminant avec un lot de spiramycine de stabilité prouvée pour un nombre limité (31) de souches : six de phénotype sauvage, cinq MLS_B, 16 résistantes à bas niveau à la spiramycine, une résistante à bas niveau à la seule lincomycine et trois résistantes à bas niveau à la spiramycine et la lincomycine. Pour dix souches résistantes à bas niveau à la spiramycine, les CMI étaient inférieures d'une dilution (4 mg/L au lieu de 8 mg/L) ; pour les 21 autres souches, les valeurs des CMI étaient identiques.

Les CMI d'azithromycine (Figure 19) et de tylosine (Figure 20) ont ensuite été mesurées pour ces 31 souches. Les 19 souches de CMI de spiramycine égales à 4-8 mg/L étaient sensibles à l'azithromycine et à la tylosine, avec des CMI identiques à celles des souches (n=6) de phénotype sauvage. Ceci confirmait qu'il existe des souches de *S. uberis*

présentant une résistance isolée à la spiramycine. Un tel phénotype n'a, à notre connaissance, jamais été décrit chez des streptocoques, mais des souches de *S. uberis* semblables ont déjà été mises en évidence en France (Morvan *et al.*, 1997 ; Bouveron, 2000) à une fréquence élevée, 18 % d'après Bouveron (2000).

Figure 19 : Distribution des CMI d'azithromycine (en mg/L) pour 31 souches de *Streptococcus uberis* issues de laits de mammites cliniques chez la vache.

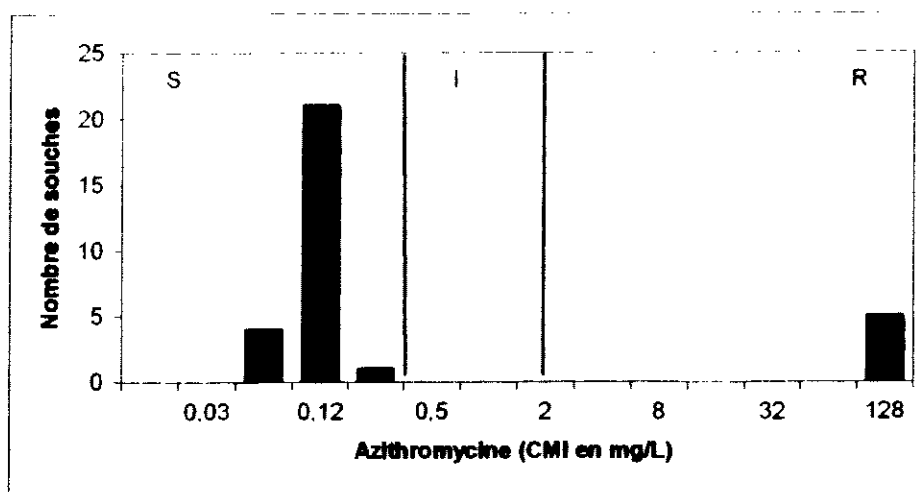
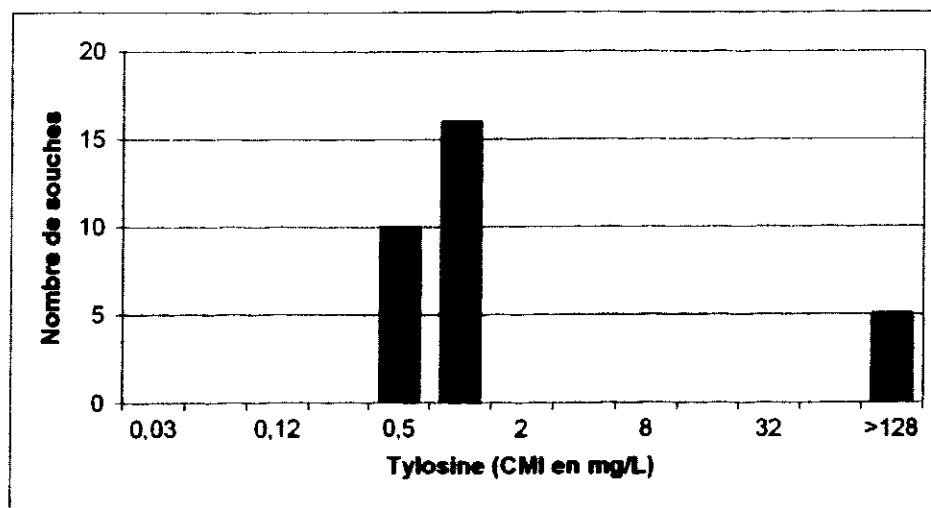


Figure 20 : Distribution des CMI d'azithromycine (en mg/L) pour 31 souches de *Streptococcus uberis* issues de laits de mammites cliniques chez la vache.

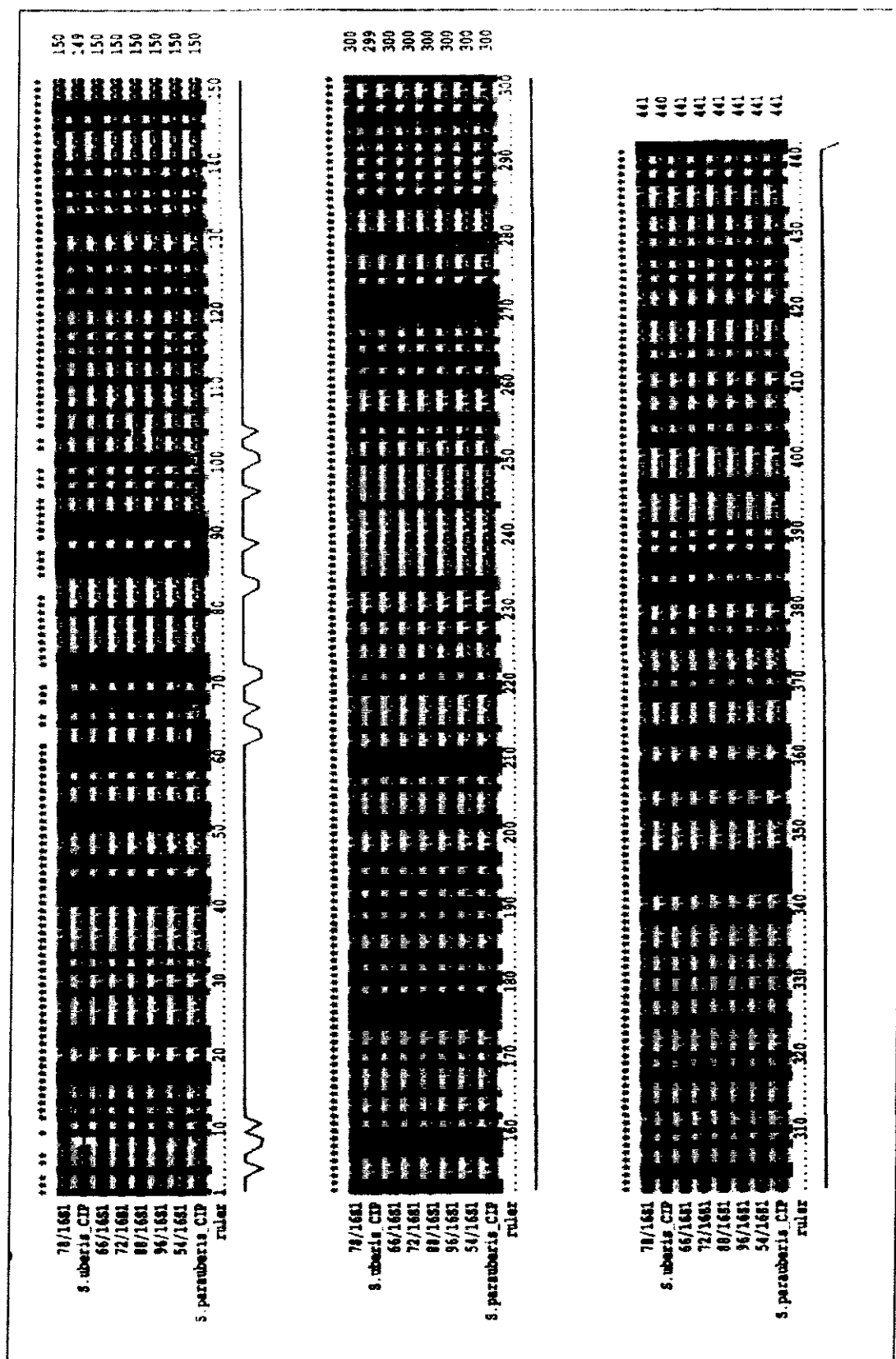


Ce phénotype pourrait correspondre à un nouveau mécanisme de résistance chez *S. uberis*. Il pourrait être aussi dû à une mauvaise à une mauvaise identification de *S. uberis*. En effet, il n'est pas possible de distinguer par les caractères phénotypiques *Streptococcus uberis* de *Streptococcus parauberis*, deux espèces responsables d'infections mammaires chez la vache. La spiramycine pourrait avoir une activité différente sur ces deux espèces, qui pourraient être associées dans la collection testée. Cette hypothèse a été vérifiée en identifiant par une technique moléculaire (amplification puis séquençage d'une portion de gène codant pour l'ARN 16S) six souches de « *S. uberis* », trois de CMI égales à 0,5 mg/L et trois de CMI égales à 8 mg/L (Tableau XIV).

Le résultat est présenté sous forme de séquences alignées (Figure 21). Les séquences obtenues étaient de l'ordre de 460 à 470 paires de bases ; 441 paires de base ont été alignées. Chaque base azotée de l'ADN est caractérisée par une fluorescence différente et est représentée par une couleur différente sur la figure. La séquence de la souche type de *Streptococcus parauberis* CIP 103956 comportait 11 bases azotées différentes de la souche type de *Streptococcus uberis* CIP 103219 en positions 62, 63, 66, 70, 71, 82, 83, 88, 95, 99 et 100. La souche type de *S. uberis* comportait un « trou » (-) en position 8 et une base azotée non identifiée en position 10. L'analyse du chromatogramme n'a pas permis de corriger et d'identifier avec précision cette base. La souche 88 présentait une base non identifiée en position 103 tout comme la souche 96 en position 7.

Les six souches cliniques étudiées avaient une séquence identique à celle de la souche type de *S. uberis*, et les différences de CMI de spiramycine ne sont pas à relier à une mauvaise identification. Il est très probable qu'il existe un mécanisme de résistance acquise à la spiramycine chez les souches de *Streptococcus uberis* de CMI = 4-8 mg/L.

Figure 21 : Séquences obtenues après PCR pour six souches sauvages de *S. uberis* / *S. parauberis* et les deux souches-types.



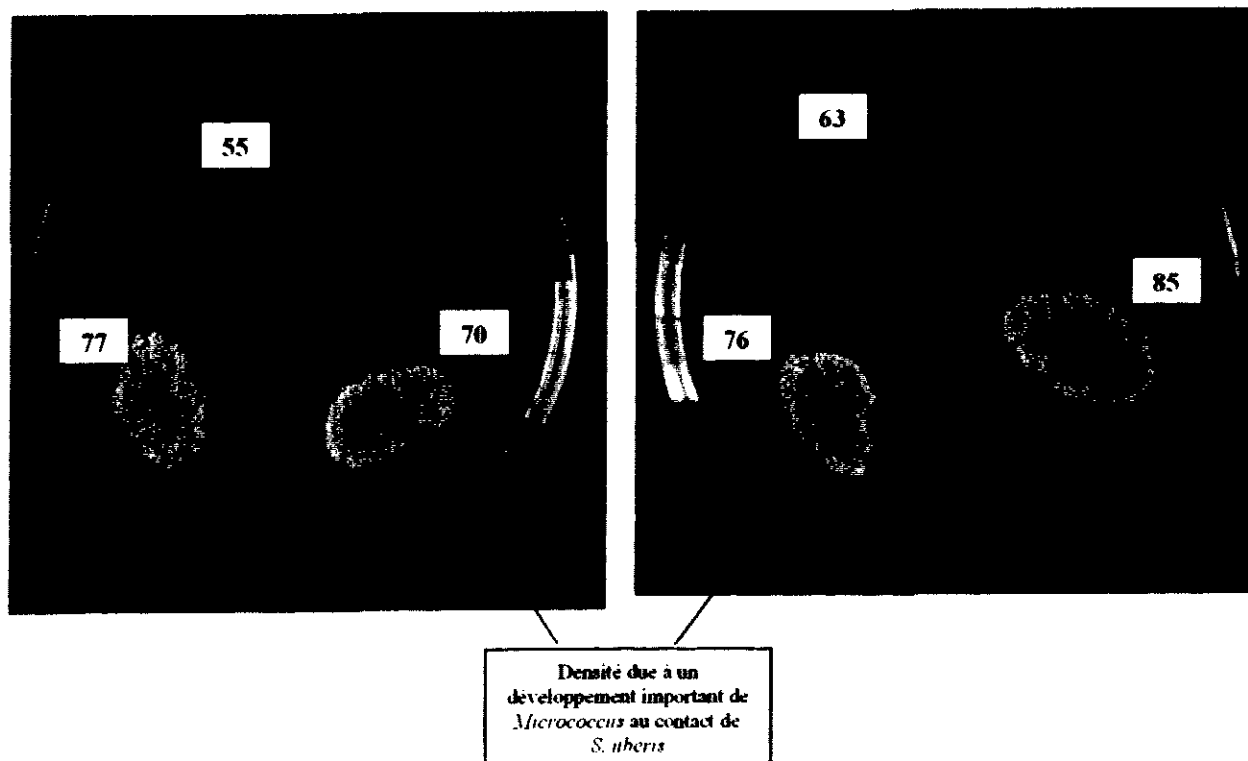
Une mutation des cibles ribosomales est peu vraisemblable car plusieurs molécules du groupe des macrolides et apparentés auraient alors leur activité modifiée.

Une imperméabilité ou un efflux actif est possible, la résistance étant alors souvent de bas niveau d'expression. Il est fréquent, lorsqu'un de ces deux derniers mécanismes de résistance est en jeu, que la résistance concerne plusieurs molécules de familles différentes. Dans l'étude de Bouveron (2000), des souches de *S. uberis* résistantes à bas niveau à la pénicilline G, ou résistantes à bas niveau à la lincomycine, ou résistantes à la tétracycline avaient été mise en évidence. Pour les 36 souches de cette étude sensibles à la spiramycine (n=27) ou résistantes à bas niveau (n=9), les fréquences de résistance à la tétracycline, ou à la pénicilline G, ou à la lincomycine n'étaient pas significativement différentes chez les souches de CMI de spiramycine basses et chez celles de CMI de spiramycine élevées (test exact de Fisher, $p = 0,1506$ pour la tétracycline, $p = 0,2153$ pour la pénicilline G, $p = 0,0876$ pour la lincomycine).

L'effet de deux inhibiteurs des pompes d'efflux, la réserpine et le PANA, sur les CMI de spiramycine a été mesurée pour 19 souches de *S. uberis* dont 11 résistantes à bas niveau à la spiramycine. En présence de PANA, les CMI de spiramycine n'étaient pas modifiées sauf pour une souche (-1 dilution). L'addition de réserpine a entraîné une augmentation des CMI d'une à trois dilutions suivant la concentration finale (5 mg/L ou 10 mg/L). Un efflux actif ne serait donc pas le mécanisme responsable de la résistance.

La production éventuelle d'une enzyme modifiant la spiramycine a été recherchée par le test de satellitisme de Gots chez quatre souches résistantes. A la concentration finale de 2 mg/L de spiramycine, le microcoque n'a poussé qu'en présence des souches de *S. uberis* ; la croissance était nettement meilleure en présence de souches de CMI égales à 4 ou 8 mg/L qu'en présence de la souche témoin MLS_B ; la souche 55 sensible n'a pas poussé (Figure 22), la résistance à bas niveau à la spiramycine de souches de *S. uberis* pourrait correspondre à un phénomène d'inactivation enzymatique.

Figure 22 : Test de satellitisme de Gots sur six souches de *S. uberis* : deux témoins négatifs avec une souche sauvage (n°55) et une souche de phénotype MLS_B (n°63) ; quatre souches de résistance de bas niveau (n°70, n°76, n°77 et n°85).

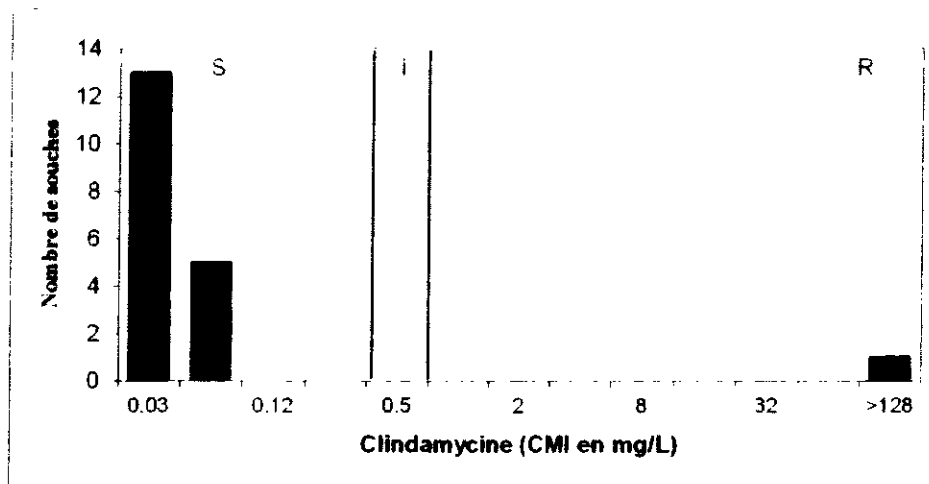


3) Etude des souches de *S. uberis* résistantes à bas niveau à la lincomycine

Parmi les souches classées sensibles à la lincomycine, cinq étaient de sensibilité diminuée (CMI = 2 mg/L). Ce type de souche a déjà été décrit (Guérin-Faublée *et al.*, 2002).

Ces souches étaient sensibles à la clindamycine avec des CMI égales à 0,03-0,06 mg/L (Figure 23), du même ordre de grandeur que celles des souches sensibles aux macrolides et apparentés. L'activité bactériostatique de la clindamycine n'est donc pas modifiée chez ces souches.

Figure 23 : Distribution des CMI de clindamycine (en mg/L) pour 19 souches de *Streptococcus uberis* issues de laits de mammites cliniques chez la vache.



En présence de réserpine à la concentration finale de 10 mg/L, les CMI de lincomycine étaient soit non modifiées, soit augmentées d'une dilution.

Pour quatre souches, un test de Gots positif a été obtenu : la souche du microcoque poussait en présence de 0,1 mg/L de lincomycine, mais sa croissance était nettement supérieure au contact des souches de *S. uberis* de CMI de lincomycine élevées. L'inactivation de la lincomycine par des souches de streptocoques animales a déjà été rapportée (Dutta et Devriese, 1982 ; Roberts et Brown, 1994) ainsi que chez *Enterococcus faecium* (Bozdogan *et al.*, 1999).

III. Discussion

Le but de cette étude était d'évaluer l'activité de la spiramycine sur de souches de *S. aureus* et de *S. uberis* isolées de mammites cliniques chez la vache. En effet, d'après les résultats des antibiogrammes réalisés quotidiennement par les laboratoires de biologie vétérinaire, beaucoup de souches sont catégorisées « intermédiaires » ou résistantes. Cette observation n'est pas à relier aux mêmes causes pour *S. aureus* et *S. uberis*.

A. *Staphylococcus aureus*

Les valeurs des CMI de spiramycine pour les souches de *S. aureus* de phénotype sauvage sont très variées suivant les auteurs :

- Bryskier et Bergogne-Bérézin (1999) et Hamilton-Miller (1992) donnent une CMI₅₀ égale à 1 mg/L et 2,5 mg/L respectivement, pour les souches méti-S ;

- selon Devriese (1980b), pour 595 souches animales, les CMI variaient de 1,6 à 12,5 mg/L avec une modale égale à 6,3 mg/L. Dans une étude plus récente, en Belgique, en 1997-2002, la CMI₅₀ et la CMI₉₀ pour des souches isolées d'infections mammaires étaient égales à 2 mg/L (Devriese, communication personnelle) ;

- Sanders (1992), citant Le Noc *et al.* (1989), rapporte une étendue de 0,25 mg/L à 2 mg/L pour des souches humaines et, pour des souches animales, d'après Perrin-Couilloud *et al.* (1991), une étendue de 0,5 à 8 mg/L ;

- dans la synthèse bibliographique de Laval (1990), l'étendue des CMI est de 3,06 à 3,77 mg/L ;

- pour Morvan *et al.* (1997), la modale est de 4 mg/L pour les souches isolées en France à partir de mammites cliniques bovines.

Les variations de CMI modales (facteur de 1 à 8-16) pour les souches sauvages de *S. aureus* selon les publications sont vraisemblablement à relier à un problème technique. Elles pourraient être liées à la difficulté de connaissance du titre exact en mg de substance active par mg de poudre ou à l'utilisation d'un mauvais coefficient de correction si le titre est exprimé en UI/mg. En effet, les titres des préparations de spiramycine sont évalués par un titrage microbiologique. Avec la modification des procédés de purification (Aventis, communication personnelle), l'étalon OMS, qui était disponible dans les années 80 et qui établissait une correspondance entre titre en UI et masse (3 200 UI/mg), n'est plus valide. Une autre explication de l'apparente augmentation des CMI des souches sensibles en 20 ans pourrait être une modification insidieuse de la technique, en particulier du milieu de Mueller-Hinton (pH, présence d'un inhibiteur) dont la composition a évolué dans le temps.

Il est nécessaire de s'interroger sur le statut clinique de ces souches « sensibles » au sens bactériologique du terme. Peu de données pharmacocinétiques sont disponibles (cf. IV de la partie bibliographique). Certaines (Sanders *et al*, 1992) ont été établies par titrage microbiologique ; elles ne peuvent alors être comparées aux CMI mesurées en mg/L. D'après Ziv (1980a), des concentrations actives de spiramycine seraient obtenues dans un lait de mammite pendant 12h et 8h, pour des souches bactériennes de CMI respectivement égales à 4 et 8 mg/L, après l'injection par voie intramusculaire d'une dose de 10 mg/kg d'adipate de spiramycine ; l'emploi de spiramycine-base à la même posologie ne permettrait de maintenir des concentrations actives que pendant 8 h pour les souches de CMI égales à 4 mg/L. Les concentrations obtenues dans les sécrétions mammaires au tarissement lors d'un traitement par voie générale (10 mg/kg par voie intramusculaire) sont inférieures à 5 mg/L (Tableau VIII) (Ziv, 1991) et inférieures à 10 mg/L, 5 à 10 jours après le traitement par voie diathélique (pommade intramammaire contenant 300 mg d'adipate de spiramycine) (Figure 4) (Ziv, 1980b). Les bases d'obtention de ces données (Ziv, 1980a, 1980b, 1991) n'étant pas précisées dans les publications, elles ne semblent pas utilisables pour établir les paramètres pharmacodynamiques pour la spiramycine et les infections mammaires par des staphylocoques dorés.

Des essais cliniques ont montré l'intérêt thérapeutique de la spiramycine dans le traitement des mammites cliniques staphylococciques et dans les traitements hors lactation (Laval, 1992). Sauf à remettre en cause ces observations anciennes, les souches de *S. aureus* de CMI de spiramycine égales à 4-8 mg/L isolées d'infections mammaires doivent être considérées comme sensibles à cette molécule.

Dans l'état actuel de nos connaissances, les techniques d'antibiogramme ne sont pas utilisables pour étudier la sensibilité de *Staphylococcus aureus* à la spiramycine. Des concentrations critiques (et ultérieurement des diamètres critiques) devraient être redéfinies. Celles préconisées par le CA-SFM ne sont pas adaptées, notamment parce qu'elles séparent en deux une population visiblement homogène. De plus, elles ne s'appliquent pas aux traitements des infections locales chez l'animal. Cependant, la réalisation d'un antibiogramme pour les staphylocoques et les macrolides et apparentés peut être demandée. L'antibiogramme par diffusion réalisé avec deux molécules (l'érythromycine et la lincomycine) permet, par

lecture interprétative, de prédire le statut S ou R vis-à-vis de la spiramycine de la souche testée (Tableau XXXI)

Tableau XXXI : Catégorisation clinique de souches de *S. aureus* pour la spiramycine à partir de l'antibiogramme par diffusion réalisé sur l'érythromycine et la lincomycine.

Erythromycine	Lincomycine	Phénotype observé	Phénotype prédit pour la spiramycine
✓	✓	Sensibles aux macrolides et apparentés	✓
		MLS _B constitutif	
	S et antagonisme érythromycine - lincomycine S et absence d'antagonisme	MLS _B inductible Efflux	✓ ✓
✓		Inactivation des lincosamides	✓

Les souches de CMI comprises entre 4 et 8 mg/L seront alors rendues S.

B. *Streptococcus uberis*

Les souches de *S. uberis* de CMI de spiramycine égales à 4-8 mg/L forment une population homogène ayant acquis un mécanisme de résistance, peut-être une enzyme inactivatrice. Des glycosyl transférases ont été décrites chez *Streptomyces ambofaciens*, al bactérie productrice de spiramycine. L'une d'elles *gimA*, inactive la forocidine, un précurseur de la spiramycine ; elle modifie aussi la tylosine et induit une résistance à cette molécule *in vivo*. Par contre, la spiramycine est un mauvais substrat (Gourmelen *et al.*, 1998).

Le statut clinique des souches de *S. uberis* résistante à bas niveau à la spiramycine reste à établir. En attendant, dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de rendre un résultat fiable d'antibiogramme pour *S. uberis* et la spiramycine.

CONCLUSION

Les mammites d'origine infectieuse constituent une pathologie dominante chez la vache laitière. *Streptococcus uberis* est l'espèce la plus fréquemment isolée lors de mammité clinique et est en cause dans la plupart des réinfections pendant le tarissement. *Staphylococcus aureus* est responsable de la majorité des mammites subcliniques. Le diagnostic des infections mammaires doit être le plus précoce possible. La mise en place rapide d'un traitement augmente notablement les chances de guérison et évite le passage à la chronicité.

Le traitement des mammites en lactation a recours à l'administration d'antibiotiques par la voie diathélique et, éventuellement, par voie générale. Des antibiotiques sont aussi, systématiquement prescrits au tarissement dans le but de guérir les infections mammaires et de prévenir les réinfections. Les molécules disponibles pour ces traitements sont des β -lactamines, des aminosides, des macrolides et apparentés, et la tétracycline. La spiramycine a été et reste très employée.

De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus uberis* isolées de laits de vache sont actuellement catégorisées « intermédiaires » vis-à-vis de la spiramycine lors de la réalisation d'un antibiogramme par la technique de diffusion dite des disques. Ceci limite l'emploi de cette molécule à spectre étroit au profit de molécules récentes de spectre large. L'activité de la spiramycine a donc été réévaluée par la mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de macrolides et apparentés par la technique de référence de dilution en milieu gélosé.

Les souches de *S. aureus* de phénotype sauvage pour les macrolides sont catégorisées « intermédiaires » ou « résistantes » à la spiramycine d'après les concentrations critiques. L'intérêt clinique de cette molécule dans le traitement des infections mammaires par des coques à Gram positif n'étant pas à remettre en question, les concentrations critiques pour l'interprétation des résultats de l'antibiogramme seraient à redéfinir.

Pour *S. uberis*, il existe à côté des populations sensibles et des populations résistantes de phénotype MLS_B, des souches de CMI élevées de spiramycine, qui inactiveraient spécifiquement cette molécule. Le statut clinique de ces souches doit être précisé.

Cette étude montre la nécessité de réévaluer régulièrement la méthodologie de l'antibiogramme pour les souches d'origine animale afin d'améliorer le pouvoir prédictif de cette technique.

Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

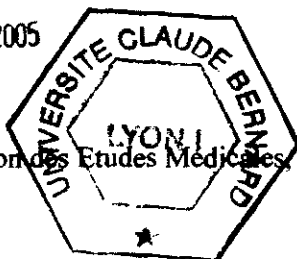
Le Président de la thèse

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le

22 JUIL. 2005

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur D. VITAT-DURAND



Annexe 1 . Préparations à base d'embonate de spiramycine commercialisées en médecine vétérinaire (Anonyme, 2005)

Nom déposé Laboratoire	Présentation	Composition en spiramycine (en U.I.)	Administration Espèces ciblées Posologie (PV : Poids Vif)
Alframix Aspiter Santamix®	Prémélange	12,8 M.U.I. (4 g) pour 100 g	Voie orale (après dilution dans la ration) Porcins : 12-18 mg de spiramycine/kg PV/24 h Volailles, gibier : 15 mg de spiramycine/kg PV/24 h
Cofamix® STS 358 Coophavet	Prémélange	20 M.U.I. pour 100 g	Voie orale Veaux, porcs, lapins, volailles : 100 000/kg PV/j soit 0,5 g de prémélange/kg PV/jour
Prémélange médicamenteux Z 22 Franvet	Prémélange	9,9 M.U.I. pour 100 g	Voie orale dans l'aliment médicamenteux Porcs : 7,5 mg de spiramycine/kg/12 h
Santamix® Spira 40 Santamix	Prémélange	12,8 M.U.I. pour 100 g	Voie orale dans la ration Porcins : 12-18 mg du prémélange/kg PV/j Volailles : 25-35 mg/kg PV/jour

Annexe 2 : Préparations à base d'adipate de spiramycine commercialisées en médecine vétérinaire (Anonyme, 2005).

Nom déposé Laboratoire	Présentation	Composition en spiramycine (en U.I.)	Administration Espèces ciblées Posologie (PV : Poids Vif)
Altibiotic® 75 + 50 Coophavet	Poudre injectable	75 M.U.I. à dissoudre dans 500 ml d'eau	I.M., S.C. ou I.P. Bovins : 0,25 à 0,5 ml/kg PV Veaux, porcs : 0,25 à 1 ml/kg PV Porcelets : 0,25 à 0,5 ml/kg Volailles : 0,5 à 1 ml/kg
Biotess® Virbac	Poudre orale	6,4 M.U.I. pour 100 g	Voie orale Volailles, lapins et porcelets : 5 g/10 kg PV soit 5 g par litre de boisson par jour
Cofamycine®500 Coophavet	Solution injectable	75 M.U.I. pour 500 ml d'eau p.p.i	I.M. ou S.C. Veaux, agneaux, chevreaux, porcins, lapins, volailles : 1 ml/kg PV sans dépasser 100 ml
Colspi® Solution injectable Virbac	Solution injectable	32 M.U.I. pour 100 ml	I.M. Veaux, porcelets, agneaux : 1 ml/4 kg PV
Compomix® V Spiracycline Noé	Poudre orale	55 M.U.I pour 1 000 g	Voie orale Veaux, agneaux, porcelets, lapins, volailles : 5 g/10 kg PV
C.R.D® 92 Coophavet	Poudre orale	50 M.U.I. pour 100 g	Voie orale Veaux, agneaux, chevreaux, porcins, lapins et volailles : 2 g/10 kg PV
Entéro Porcelet® Coophavet	Pâte orale	2,40 M.U.I. pour un applicateur de 12 g	Voie orale Porcelets : 1,2 g/5 kg PV
Pneumobiotique® Biové	Poudre orale soluble	25 M.U.I. pour 100 g	Voie orale Veaux : 5 g/50 kg PV/12 h Porcins : 1 g/10 kg PV/12 h Volailles, lapins : 1-2 g/litre d'eau de boisson
Spéciorlac® Merial	Pommade intramammaire hors lactation	1,2 M.U.I. pour 5 g	Intramammaire Vaches : un tube par quartier
Spiraphar® Chat et Petit Chien Virbac	Comprimé	0,15 M.U.I. pour 120 g (1 comprimé)	Voie orale Jeunes chats : 1 cp/12 h Chats adultes et chiens <5 kg : 2 cps/12 h
Spiraphar® Chien Virbac	Comprimé	0,9 M.U.I pour 120 g (1 comprimé)	Voie orale Chiens : 1 cp/10 kg PV
Suanovil® 50 Merial	Poudre orale soluble	150 M.U.I. pour 100 g	Voie orale Veaux, volailles : 1 g/10 kg PV Porcins : 5 g/75 kg PV

Annexe 3 : Préparations à base de spiramycine base commercialisées en médecine vétérinaire (Anonyme, 2005).

Nom déposé Laboratoire	Présentation	Composition en spiramycine (en U.I.)	Administration Espèces ciblées Posologie (PV : Poids Vif)
Anticoryza® Moureau Moureau	Poudre orale	25,55 M.U.I. pour 100 g	Voie orale Volailles, pigeons : 2 cuillerées à café par litre d'eau de boisson
Buccoval® Chien nain Sepval	Comprimé	75 000 U.I. pour 195 mg (1 comprimé)	Voie orale Chiens <5 kg : 75 000 U.I./kg PV soit 1 cp/kg PV
Buccoval® Grand chien Sepval	Comprimé	750 000 U.I. pour 1,95 g (1 comprimé)	Voie orale Chiens >20 kg : 1 cp/10 kg PV
Buccoval® Petit chien Sepval	Comprimé	375 000 U.I. pour 975 mg (1 comprimé)	Voie orale Chiens 5-15 kg : 1 cp/5 kg PV
Captalin® Merial	Solution injectable	100 M.U.I. pour 100 ml	I.M. Traitement bovins : 1 ml/10 kg PV 2× à 48h d'intervalle Métabylaxie bovins : 1 ml/10 kg en une injection unique
Histacetyl G.M.® Comprimés TVM	Comprimé	507 000 U.I. pour 1 comprimé	Voie orale Chiens : 1cp pour 5 à 7 kg/24 h
Histacetyl P.M.® Comprimés TVM	Comprimé	117 000 U.I. pour 1 comprimé	Voie orale Chiens : 1 cp pour 2 kg/24 h
Spirovet® CEVA	Solution injectable	600 000 U.I. pour 1 ml	Voie I.M. profonde Bovins adultes : 30 000 U.I./kg soit 5 ml/100 kg PV Veaux, porcins : 75 000 U.I./kg soit 5 ml/40 kg PV
Stomorgyl® Stomorgyl® P.A. Merial	Comprimé	750 000 U.I. ↔ 1 cp 100 000 U.I. ↔ 1 cp	Voie orale Chiens, chats : 1 cp pour 10 kg pour le Stomorgyl® et 1 cp/kg pour Stomorgyl®P.A.
Suanovil® 20 Merial	Solution injectable	60 M.U.I. pour 100 ml	Voie I.M. profonde Bovins adultes : 30 000 U.I./kg soit 5 ml/100 kg PV

|

|

BIBLIOGRAPHIE

1. Agence Française de Sécurité Française des Aliments. Rapport intermédiaire : Utilisation des antibiotiques chez l'animal et résistance aux antibiotiques chez les bactéries d'origine animale. Programme français 1999-2000.
http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/rapportatbr_intermediaire.pdf
2. Alber J., El-Sayed A., Lämmler C., Hassan A., Zschöck M. Polymerase Chain Reaction mediated identification of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* using species-specific sequences of the genes encoding superoxide dismutase A and chaperonin 60. *Journal of Veterinary Medicine B* ; 2004, **51** : 180-184.
3. Alzieu J.-P., Lévrier B., Libersa M., Bichot H. J., Van Gool F., Bayle R., Espinasse J. Efficacité et activité longue action de la spiramycine sur des jeunes bovins atteints de BPIE. XV^e Congrès Mondial de la Buiatrie, Palma de Majorque, Octobre 1988.
4. Anonyme. Détection d'un enzyme inactivateur des antibiotiques. In *L'antibiogramme* (Courvalin P., Goldstein F., Philippon A., Sirot J. Eds), mpc-vidéom, Paris ; 1985 : 41-48.
5. Anonyme. Dictionnaire des Médicaments Vétérinaire. (ouvrage sous la direction de Petit S.). Editions du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 2005, 1765 p.
6. Bergogne-Bérézin E. Spiramycin concentrations in the respiratory tract: a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 1988, **22**, Suppl.B : 117-122.
7. Bismuth R., Leclercq R. *Staphylococcus aureus* et antibiotiques. In *Précis de bactériologie clinique* (Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. Eds), Ed ESKA, Paris ; 2000 : 611-618.
8. Bouveron C. Evaluation de la résistance aux antibiotiques de streptocoques responsables de mammites cliniques chez la vache. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 2000, 73 p.
9. Bozdogan B., Berrezouga L., Kuo M.-S., Yurek D. A., Farley K. A., Stockman B. J., Leclercq R. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleodilation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 1999, **43** : 925-929.
10. Bramley A.-M. *Streptococcus uberis* udder infection – a major barrier to reducing mastitis incidence. *British Veterinary Journal* ; 1984, **140** : 328-335.
11. Brenwald N. P., Gill M. J., Wise R. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 1998, **42** : 2032-2035.
12. Brisson-Noël A., Trieu-Cuot P., Courvalin P. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 1988, **22**, Suppl. B : 13-23.
13. Brook I. Synergy between spiramycin and metronidazole in treatment of polymicrobial infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 1988, **22** : 13-23.

14. Bryskier A. Histoire et renouveau des macrolides. *La Presse Médicale* ; 1997, **26** : 1063-1069.
15. Bryskier A., Bergogne-Bérézin E. Les macrolides. In *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques* (Bryskier A. Ed), Editions Ellipses, Paris ; 1999 : 499-561
16. Buragohain J., Dutta G. N. A new type of macrolide resistance in staphylococci from bovine subclinical mastitis. *Research in Veterinary Science* ; 1990, **49** : 248-249.
17. Buu-Hoi A. Cocci à Gram positif et macrolides-lincosamides-streptogramines. In *L'antibiogramme* (Courvalin P., Goldstein F., Philippon A., Sirot J. Eds), mpc-vidéom, Paris ; 1985 : 41-48.
18. Canu A., Leclercq R. Les macrolides : une diversité de mécanismes de résistance. *Médecine et Maladies Infectieuses* ; 2002, **32** Suppl 1 : 32-44.
19. Canu A., Malbrunoy B., Coquemont M., Davies T. D., Appelbaum P. C., Leclercq R. Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 2002, **46**, 125-131.
20. Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires. Isolement et identification des principaux germes de mammites des ruminants. Programme d'accréditation n°116 du COFRAC, CNEVA, Maisons-Alfort ; 1996.
21. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Technical recommendations for in vitro susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* ; 1996, **2**, Suppl 1 : S11-S25.
22. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Communiqué 2004. [http : www.sfm.asso.fr](http://www.sfm.asso.fr).
23. Depardieu F., Courvalin P. Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 2001, **45** : 319-323.
24. Desnottes J. F., Diallo N., Moret G. Effect of spiramycin on adhesiveness and phagocytosis of gram-positive cocci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 1988, **22**, suppl.B : 25-32.
25. Devriese L. A. *In vitro* susceptibility and resistance of animal staphylococci to macrolide antibiotics and related compounds. *Annales de Recherches Vétérinaires* ; 1976, **7** : 65-74.
26. Devriese L. A. Two new types of resistance to lincomycin in pathogenic staphylococci from animals. *Annales de Microbiologie de l'Institut Pasteur* ; 1980a, **131B** : 261-266.
27. Devriese L. A. Sensitivity of staphylococci from farm animals to antibacterial agents used for growth promotion and therapy. A ten year study. *Annales de Recherches Vétérinaires* ; 1980b, **11** : 399-408.

28. Devriese L. A., Haesebrouck F., Hommez J., Vandertmeersch R. Year survey of antibiotic susceptibility testing in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Belgium, with special reference to penicillinase. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* ; 1997, **66** : 170-173.
29. Dutta G. N., Devriese L. A. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics and degradation of lincosamide antibiotics in streptococci from bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 1982, **10** : 403-408.
30. El Solh N., Bismuth R., Allignet J., Fouace J. M. Résistance à la pristinamycine (ou virginiamycine) des souches de *Staphylococcus aureus*. *Pathologie Biologie* ; 1984, **32** : 362-368.
31. Erskine R. J., Walker R. D., Bolin C. A., Bartlett P. C., White D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal of Dairy Science* ; 2002, **85** : 1111-1118.
32. Escribano I., Rodriguez J. C., Cebrian L., Royo G. The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* ; 2004, **24** : 428-432.
33. Fabre J. M., Berthelot X., Lebreux B., Blanc M-F., Blanc M-C. Estimation de la fréquence des différents germes responsables d'infections mammaires en élevage bovin laitier dans le Sud-Ouest de la France. *Recueil de Médecine Vétérinaire* ; 1991, **142** : 823-829.
34. Fabre J. M., Morvan H., Lebreux B., Houffschmitt P., Berthelot X. Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France. 1- Mammites cliniques. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires* ; 1997a, n°3 : 17-23.
35. Fabre J. M., Morvan H., Lebreux B., Houffschmitt P., Berthelot X. Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France. 2- Mammites subcliniques. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires* ; 1997b, n°5 : 17-23.
36. Flandrois J. P., Chomar M. Characterization of *Staphylococcus aureus* nuclease by seroinhibition. In *Staphylococci and staphylococcal infections*. (J. Jeljafzewicz Ed). *Zentralblatt für Bakteriologie*, 1984, Suppl 14 : 263-265.
37. Ganière J. P., André-Fontaine G., Bourdon A., Quiniou M. A., Fourichon C. Sensibilité de *Streptococcus uberis* à divers antibiotiques utilisés dans le traitement des mammites bovines : I. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 1988 ; **139** : 301-306.
38. Gau J. Efficacité de la spiramycine dans un modèle expérimental de pasteurellose respiratoire chez le veau. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Toulouse, 1990, 97 p.
39. Gentilini E., Denamiel G., Llorente P., Godaly S., Reuelto M., DeGregorio O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science* ; 2000, **83** : 1224-1227.

40. Gourmelen A., Blondelet-Rouault M.- H., Pernodet J.- L. Characterization of a glycosyl transferase inactivating macrolides, encoded by *gimA* from *Streptomyces ambofaciens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 1998, **42** : 2612-2619
41. Guérin-Faublée V., Brun Y. La résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine animale. *Revue de Médecine Vétérinaire* ; 1999, **150** : 299-312.
42. Guérin-Faublée V., Tardy F., Bouveron C., Carret G. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *International Journal of Antimicrobial Agents* ; 2002, **19** : 219-226.
43. Hassan A. A., Khan I. U., Abdulmawjood A., Lämmler C. Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *Journal of Clinical Microbiology* ; 2001, **39** : 1618-1621.
44. Hamilton-Miller J. M. T. In-vitro activities of 14-, 15- and 16- membered macrolides against Gram-positive cocci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 1992, **29** : 141-147.
45. Jarlier V. Mécanismes de résistance aux antibiotiques. In *Précis de bactériologie clinique* (Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. Eds), Ed ESKA, Paris ; 2000 : 597-610.
46. Jones R. N., Cormigan M. G., Wanger A. Clindamycin resistance among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* ; 1996, **25** : 201-204.
47. Labro M. T. Effect of macrolides on host natural defenses. In *Macrolides: Chemistry, Pharmacology and Clinical Uses* (Bryskier A., Butzler J.P., Neu H.C., Tulkens P. M. Eds), Blackwell ; 1993 : 389-408.
48. Laval A. La spiramycine. Etude pharmacologique et conséquences pratiques. *Recueil de Médecine Vétérinaire* ; 1990, **166** : 855-863.
49. Laval A. La spiramycine : utilisation pratique en médecine vétérinaire. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires* ; 1992, n°1 : 57-61.
50. Leclercq R. Pneumocoques, autres streptocoques et antibiotiques. In *Précis de bactériologie clinique* (Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. Eds), Ed ESKA, Paris ; 2000 : 619-629.
51. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases* ; 2002, **34** : 482-492.
52. Leclercq R., Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 1991, **35** : 1267-1272.
53. Lecoindre P., Chevallier M., Gillard R., Dainin F. Prolifération Bactérienne Chronique et Maladie Inflammatoire Chronique de l'intestin grêle du chien. Evaluation de l'efficacité

thérapeutique d'une association de spiramycine et de métronidazole. *Revue de Médecine Vétérinaire* ; 1998, **149** : 843-852.

54. Leigh J. A. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Veterinary Journal* ; 1999, **157** : 225-238.
55. Mazzei T., Mini E., Novelli A., Periti P. Chemistry and mode of action of macrolides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 1993, **31**, Suppl. C : 1-9.
56. Morvan H., Cosson C. and Perez V. Activité *in vitro* de cinq antibiotiques couramment utilisés, vis-à-vis de bactéries isolées en France à partir de mammites cliniques bovines. *Le Point Vétérinaire* ; 1997, n°185 : 85-86.
57. Myllys V., Honkanen-Buzalski T., Huovinen P., Sandholm M., Nurmi E. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milky machines and antimicrobial drugs. *Acta Veterinaria Scandinavica* ; 1994, **35** : 363-369.
58. Nakajima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy* ; 1999, **5** : 61-74.
59. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement. NCCLS document M100-S11. NCCLS, wayne PA, 2001.
60. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals ; approved standard – second edition. NCCLS document M31-A2. NCCLS, Wayne PA, 2002.
61. Pravieux J.-J., Raguet Y., Brouillet P., Monsallier G., Longo F., Pielot D. Vaches laitières. Traitement à base de spiramycine : conduite à tenir au tarissement. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires* ; 2001, n°11 : 347-352.
62. Retsema J., Fu W. Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents* ; 2001, **18** : S3-S10.
63. Roberts M. C., Brown M. B. Macrolide-lincosamide resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. *Veterinary Microbiology* ; 1994, **40** : 253-261.
64. Rosato A., Vicarini H., Bonnefoy A., Chantot J. F., Leclercq R. A new ketolide, HMR 3004, active against streptococci inducibly resistant to erythromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 1998, **42** : 1392-1396.
65. Rosato A., Vicarini H., Leclercq R. Inducible or constitutive expression of resistance in clinical isolates of streptococci and enterococci cross-resistant to erythromycin and lincomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 1999, **43** : 559-562.

66. Rosenblatt J. E., Schoenknecht F. Effects of several components of anaerobic incubation on antibiotic susceptibility test results. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 1972, **1** : 433-440.
67. Sanders P. Apport des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques en antibiothérapie vétérinaire. Etude d'une formulation de spiramycine chez les bovins. Thèse de Doctorat d'Université, Institut National Polytechnique, Toulouse, 1992, 158 p.
68. Sanders P., Moulin G., Guillot P., Dagorn M., Perjant P., Delepine B., Gaudiche C., Mouro D. Pharmacokinetics of spiramycin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in lactating cows. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics* ; 1992, **15** : 53-61.
69. Schumacher P. Pharmacocinétique et activité antibactérienne d'une formulation injectable à base de spiramycine chez les jeunes bovins (Captalin ND). Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 1992, 106 p.
70. Tait-Kamradt A., Davies T., Appelbaum P. C., Depardieu F., Courvalin P., Petitpas J. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 2000, **44** : 3395-3401.
71. Traub W. H., Leonhard B. Antibiotic susceptibility tests with fastidious and nonfastidious bacterial reference strains: effects of aerobic versus hypercapnic incubation. *Chemotherapy* ; 1995, **41** : 18-33.
72. Vester B., Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 2001, **45** : 1-12.
73. Videau D. La spiramycine : bactériologie, pharmacologie, pharmacocinétique et distribution tissulaire. *Cahiers de Médecine Vétérinaire* ; 1978, **47** : 155-164.
74. Videau D., Jonchère H. Sur une modalité particulière de la spiramycine *in vitro*. *Annales de l'Institut Pasteur* ; 1957, **92** : 202-211.
75. Vincent S., Visent C. Les macrolides. *Lyon Pharmaceutique* ; 1996, **47** : 240-253.
76. Weisblum B. Resistance to the Macrolide-Lincosamide-Streptogramin Antibiotics. In *Gram-Positive Pathogens* (Fischetti *et al.*, Eds), American Society for Microbiology, Washington ; 2000 : 694-706.
77. Williams A. M., Collins M. D. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II. Description of *Streptococcus parauberis* spp. *Journal of Applied Bacteriology* ; 1990, **68** : 485-490.
78. Yoshimura H., Ishimaru M., Kojima A. Minimum Inhibitory Concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. *Journal of Veterinary Medicine B* ; 2002, **49** : 457-460.

79. Ziv G. Profil pharmacocinétique de la spiramycine chez la brebis et les vaches laitières. *Cahiers de Médecine Vétérinaire* ; 1974, **43** : 371-390.
80. Ziv G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy -2: Practical and therapeutics applications. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* ; 1980a, **75** : 469-474.
81. Ziv G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy -3: Intrammary treatment. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* ; 1980b, **75** : 657-670.
82. Ziv G. Traitement hors lactation par voie systémique : perspectives et expériences récentes. In *Mammmites des vaches laitières* (Espinasse J. Ed), Congrès de la Société Française de Buiatrie, Paris 18-19 Décembre 1991.
83. Ziv G., Sulman F. C. Absorption of antibiotics by the bovine udder. *Journal of Dairy Science* ; 1974, **58** : 1637-1644.

PERIER CHRISTOPHE

ACTIVITE DE LA SPIRAMYCINE SUR DES COQUES A GRAM POSITIF ISOLEES LORS D'INFECTIONS MAMMAIRES CHEZ LA VACHE

Thèse Vétérinaire : Lyon , 9 septembre 2005

RESUME :

La spiramycine, macrolide en C₁₆, est utilisée pour les traitements en lactation et au tarissement des mammites de la vache laitière dues à des coques à Gram positif. Actuellement, de nombreuses souches de staphylocoques et de streptocoques isolées d'infections mammaires chez la vache sont catégorisées "intermédiaires" lors de l'évaluation de leur antibiosensibilité vis-à-vis de la spiramycine par la technique de diffusion dite des disques. L'activité de la spiramycine sur de telles souches a été réévaluée par la mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de macrolides et apparentés par la technique de référence de dilution en milieu gélosé. Les CMI de spiramycine pour les souches de *Staphylococcus aureus* de phénotype sauvage étaient égales à 4-8 mg/L, ce qui les fait catégoriser intermédiaires ou résistantes. Sauf à remettre en question l'intérêt thérapeutique de la spiramycine dans le traitement des mammites staphylococciques, ces souches devraient être considérées comme sensibles, et les concentrations critiques utilisées pour la catégorisation clinique redéfinies. La distribution des CMI de spiramycine pour 43 souches de *Streptococcus uberis* a mis en évidence trois populations : une sensible (CMI = 0,25-0,5 mg/L), une résistance à bas niveau de CMI égales à 4-8 mg/L, et une résistante à haut niveau (CMI > 512 mg/L) de phénotype MLS_B. Les souches résistantes à bas niveau étaient sensibles aux autres macrolides, à la clindamycine et à la pristinamycine. Un test de Gots positif ayant été observé, ce phénotype pourrait être dû à une inactivation enzymatique de la spiramycine. Le statut clinique de ces souches reste à établir.

MOTS CLES :

- | | |
|--------------------------------|--------------|
| - <i>Staphylococcus aureus</i> | - mammites |
| - <i>Streptococcus uberis</i> | - vache |
| - résistance | - CMI |
| - spiramycine | - macrolides |

JURY :

- | | |
|------------------|--|
| Président : | Monsieur le Professeur Flandrois JP. |
| 1er Assesseur : | Madame le Professeur Guérin-Faublée V. |
| 2ème Assesseur : | Monsieur le Professeur Guérin P. |

DATE DE SOUTENANCE :

9 septembre 2005

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Le Pavillon
69610 SAINT GENIS L'ARGENTIERE