

Rôle des oiseaux sauvages et péri-domestiques dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques

Meriem Souguir

▶ **To cite this version:**

Meriem Souguir. Rôle des oiseaux sauvages et péri-domestiques dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I; Université de Sousse (Tunisie), 2023. Français. ⟨NNT : 2023LYO10305⟩. ⟨tel-04719898⟩

HAL Id: tel-04719898

https://theses.hal.science/tel-04719898v1

Submitted on 3 Oct 2024

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

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



HAL Authorization

THESE de DOCTORAT en cotutelle
Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale ED205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé

L'UNIVERSITE DE SOUSSE-FACULTE DE MEDECINE DE SOUSSE
Commission Doctorale en Sciences de la Santé

Discipline : Microbiologie

Soutenue publiquement le 12/12/2023, par :

SOUGUIR Meriem

Rôle des oiseaux sauvages et péri-domestiques dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques

---

Devant le jury composé de :

Pr. MTIRAOUI, Ali	Professeur, Université de Sousse	Président du jury
Pr. CHOUCHANI, Chedly	Professeur, Université de Carthage	Rapporteur
Dr. DOUBLET, Benoît	Directeur de recherche INRAE	Rapporteur
Pr. SOUILEM, Ouajdi	Professeur, ENMV Sidi Thabet	Examinateur
Dr. VIANNEY, Anne	Maître de Conférence UCBL1	Examinatrice
Dr. HAENNI, Marisa	Chargée de Recherche ANSES	Directrice de thèse
Dr. MANSOUR, Wejdene	Maître de Conférence, Université de Sousse	Directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Université de Sousse

Président de l'Université	M. Lotfi BELKACEM
Vice-président de l'Université	M. Moez KHNISSI
Vice-président de l'Université	Mme Olfa BOUALLEGUE

Faculté de Médecine de Sousse

Doyen de la Faculté	M. Hèdi KHAIRI
Vice doyen	M. Mohamed BEN DHIEB

Bureau des études doctorales en Sciences de la Santé

Coordinatrice	Mme Sihem HMISSA
Coordinatrice adjointe	Mme Wejdene MANSOUR

Ce travail de thèse a été effectué au sein de deux structures de recherche :

ANSES - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail- Laboratoire du Lyon- Unité Antibiorésistance et Virulences Bactériennes (AVB)

Adresse : 31 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon



Laboratoire de Recherche "Biophysique métabolique et Pharmacologie Appliquée" LR12ES02

Faculté de Médecine de Sousse- Université de Sousse

Adresse : Rue Mohamed Karoui Sousse - 4002 Tunisie



Remerciements

Au moment de conclure ce chapitre de ma vie académique, je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse. Le chemin vers cette réalisation a été parsemé de défis, mais il a été rendu possible grâce au soutien, à l'encouragement et à la contribution de nombreuses personnes exceptionnelles.

Les premières personnes que je tiens à remercier sont bien évidemment mes directrices de thèse : **Wejdene MANSOUR** et **Marisa HAENNI**. Je suis vraiment reconnaissante envers vous pour tout ce que vous avez apporté dans ma vie au cours de ces dernières années, une période marquée par une multitude d'émotions et de moments inoubliables. Je tiens à exprimer ma sincère gratitude pour les précieuses leçons que vous m'avez transmises, les partages enrichissants, et pour le soutien inestimable qui m'a encouragé à entreprendre cette aventure. Cette expérience m'a permis de grandir, tant sur le plan professionnel que personnel, et je ne saurais jamais assez-vous remercier pour cela.

Je voudrais également remercier M. **Jean-Yves MADEC**, chef de l'équipe AVB, et Mme **Maha BEN FEDJ**, chef de laboratoire de recherche "Biophysique métabolique et Pharmacologie Appliquée" de la faculté de médecine de Sousse, pour leur confiance et leur accueil au sein de leurs équipes respectives. J'ai vraiment eu la chance de faire partie de votre groupe de recherche pendant mes études de doctorat.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du jury : merci à M. **Chedly CHOUCHENI** et à M. **Benoît DOUBLET**, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, à M. **Ouajdi SOUILEM** et à Mme **Anne VIANNEY** pour avoir examiné ce travail et un grand merci à M. **Ali MTIRAOUI** pour m'avoir donné l'honneur de présider ce jury. Merci à chacun d'entre vous pour l'intérêt porté à mon travail.

Je pense aussi évidemment à l'ensemble de l'équipe AVB grâce à laquelle j'ai rencontré des personnes formidables et avec qui j'ai eu un réel plaisir de travailler. Merci en particulier à **Pierre**, **Séverine**, **Estelle**, **Véronique**, **Pauline, Antoine**, et **Laetitia**. Vous étiez là à chaque question, toujours prêts à apporter votre aide et vos conseils. Je suis vraiment ravie de vous avoir rencontrés dans ma vie.

Mes remerciements s'adressent également à mon équipe de recherche en Tunisie. Les discussions intellectuelles, les échanges d'idées et les moments de collaboration ont été une source constante d'inspiration pour moi. Je n'oublie pas non plus nos moments de convivialité en dehors du laboratoire, qui ont renforcé notre cohésion en tant qu'équipe. Ces instants de détente et de partage ont contribué à créer un environnement propice à la collaboration et à l'amitié.

Je tiens à adresser des remerciements tout particuliers et chaleureux à notre chère **Sana AZAIEZ** pour l'aide inestimable qu'elle m'a apportée. Sa présence a été une source d'inspiration et de motivation pour moi, et je suis profondément reconnaissante de l'avoir comme collègue et amie.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à mes collègues doctorants à l'ANSES : **Laila**, **Maissane**, **Morgane** et **Manon**. Ensemble, nous avons non seulement partagé des idées et des connaissances, mais aussi des moments de joie, de célébration et d'entraide. Cette aventure de doctorat a été d'autant plus significative grâce à la naissance de ces amitiés, et je suis reconnaissante de vous avoir comme collègues et amis. J'espère sincèrement avoir le plaisir de vous revoir à un moment donné de nos vies.

A ma chère **Sana Ncir :** le jour de ma soutenance, alors que je franchissais une étape importante de ma vie académique, tu étais en train de donner naissance à une nouvelle vie. Bien que nos chemins aient pris des directions différentes ce jour-là, je n'aurais pas pu rêver d'une synchronicité plus belle et plus significative. Ta présence dans ma vie a été une source constante de soutien, et je suis honoré de pouvoir célébrer nos réussites respectives, même à distance. Merci pour ton amitié, ton soutien indéfectible, et pour rendre ce jour encore plus spécial.

A ma chère **Ahlem** : Ton amitié a été un véritable cadeau, et je suis infiniment reconnaissante de t'avoir à mes côtés. Merci pour tes encouragements sincères, et pour avoir partagé cette aventure académique avec moi. Je te souhaite le succès et le bonheur constant dans ta vie professionnelle et personnelle.

A mes chers amis : **Imen** et **Mahdi**, votre amitié a été une source de bonheur, de réconfort et d'inspiration au fil des années. Nos conversations sincères, nos aventures communes, et les souvenirs que nous avons créés resteront gravés dans mon cœur pour toujours. Votre amitié est un trésor que je chéris profondément.

Enfin, je voudrais exprimer mon amour, ma reconnaissance et ma fierté les plus profonds aux deux personnes qui m'ont aidée à grandir : **Maman** et **Papa**. Votre dévouement inébranlable et vos sacrifices pour mon bien-être et mon éducation ont été une source d'inspiration constante. Votre amour inconditionnel m'a permis de surmonter les obstacles et de poursuivre mes rêves. Vous êtes mes modèles de force, de persévérance et d'amour.

Mes sœurs et mon frère, votre soutien a été au cœur de mes réalisations, et je sais que je peux toujours compter sur vous, peu importe les défis qui se présentent. Ma gratitude envers vous est infinie, et je vous remercie du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi. Que notre famille continue de s'épanouir et de partager encore de nombreux moments heureux ensemble.

Cette thèse est le fruit de l'effort collectif de nombreuses personnes exceptionnelles. C'est avec un profond sentiment de gratitude que je la dédie à tous ceux qui ont fait partie de ce voyage. Votre influence perdurera bien au-delà de ces pages et continuera à façonner ma vie et ma carrière.

Merci du fond du cœur.



"The only way to do great work is to love what you do."

-Steve Jobs-

"Knowledge is the light that takes us from the darkness of ignorance to the brightness of understanding."

-Abu Nasr Al-Farabi-

Résumé

Le phénomène de la résistance aux antibiotiques (RAM) constitue une menace majeure pour la santé publique mondiale qui dépasse les frontières géographiques. Une approche "One Health" globale et multisectorielle (englobant l'Homme, l'animal et l'environnement) est aujourd'hui nécessaire pour comprendre la dynamique de diffusion de la résistance dans différents écosystèmes. La faune sauvage, et plus particulièrement les oiseaux sauvages migrateurs, constituent un réservoir important et diversifié de bactéries et de gènes de résistance, et pourrait jouer un rôle clé dans la dissémination mondiale de la RAM. Les données sur la RAM dans les oiseaux sauvages étant lacunaires à l'échelle mondiale, le projet de cette thèse était d'évaluer l'ampleur du fardeau de la RAM et sa dynamique de transmission dans deux contextes spécifiques en Tunisie, les oiseaux sauvages migrateurs (étourneaux, *Sturnus vulgaris*) et les oiseaux péri-domestiques (pigeons urbains, *Columbia livia*). La caractérisation moléculaire des bactéries résistantes isolées du microbiote intestinal de ces oiseaux a montré qu'ils étaient des réservoirs significatifs d'Enterobacterales porteuses de résistances aux céphalosporines de dernières générations (de type BLSE et AmpC), qui sont des antibiotiques critiques selon l'OMS. Nos résultats ont montré que la résistance diffuse d'une part grâce à des plasmides à caractère pandémiques tels que IncHI2/ST3 chez les étourneaux ou IncF/F-:A-:B53 chez les pigeons, et d'autre part grâce à des clones épidémiques comme par exemple *E. marmotae* ST133 chez les étourneaux ou *E. coli* ST8149 et ST5584 chez les pigeons. Par ailleurs nous avons aussi rapporté la présence d'une carbapénémase de type VIM-2 chez *Pseudomonas putida* qui constitue la deuxième détection de cette enzyme chez les pigeons à l'échelle mondiale. Ces études, les premières en Tunisie et en Afrique pour les étourneaux, confirment que ces oiseaux sont d'importants réservoirs et vecteurs potentiels de bactéries et de gènes de résistance d'importance clinique. L'origine de ces souches reste à explorer, mais une seule source anthropique semble peu probable. Nos travaux ouvrent la voie à de futures recherches sur les facteurs de propagation de la RAM chez ces oiseaux et sur l'évaluation des risques potentiels pour la santé humaine.

Mots clés : *Résistance aux antibiotiques, BLSE, Escherichia coli, Escherichia marmotae, pigeons, oiseaux sauvages, carbapénémases, AmpC, VIM-2, IncHI2, IncI, étourneaux*

Title: Role of wild and peri-domestic birds in the spread of antibiotic resistance

Abstract

The phenomenon of antibiotic resistance (AMR) represents a major threat to global public health, transcending geographical boundaries. A global, multi-sectoral "One Health" approach (encompassing humans, animals, and the environment) is now needed to understand the dynamics of resistance spread in different ecosystems. Wildlife, and migratory wild birds in particular, constitute a large and diverse reservoir of resistant bacteria and resistance genes, and could play a key role in the global spread of AMR. As data on AMR in wild birds are scarce worldwide, the aim of this thesis was to assess the extent of the AMR burden and its transmission dynamics in two specific contexts in Tunisia: migratory wild birds (starlings, *Sturnus vulgaris*) and peri-domestic birds (urban pigeons, *Columbia livia*). Molecular characterization of resistant bacteria isolated from the intestinal microbiota of these birds showed them to be significant reservoirs of Enterobacterales carrying resistance to last generations cephalosporins (ESBL and AmpC types), which are critical antibiotics according to the WHO. Our results show that resistance spreads via pandemic plasmids such as IncHI2/ST3 in starlings or IncF/F-:A-:B53 in pigeons, and via epidemic clones such as *E. marmotae* ST133 in starlings or *E. coli* ST8149 and ST5584 in pigeons. We also reported the presence of a VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas putida*, the second detection of this enzyme in pigeons worldwide. These studies, the first in Tunisia and Africa for starlings, confirm that these birds are important reservoirs and potential vectors of bacteria and resistance genes of clinical importance. The origin of these strains remains to be explored, but a single anthropogenic source seems unlikely. Our work paves the way for future research on the factors involved in the spread of AMR in these birds, and for risk assessment studies of AMR on human health.

Keywords: *Antibiotic resistance, ESBL, Escherichia coli, Escherichia marmotae, pigeons, wild birds, carbapenemases, AmpC, VIM-2, IncHI2, IncI, starlings*

Production scientifique pendant la thèse

- **Articles en premier auteure**

Article publié

Souguir, M., Châtre, P., Drapeau, A., François, P., Azaiez, S., Ncir, S., Madec, J.-Y., Mansour, W., Haenni, M., 2023. Molecular characterization of highly prevalent *Escherichia coli* and *Escherichia marmotae* resistant to extended-spectrum cephalosporins in European starlings (*Sturnus vulgaris*) in Tunisia. Microbiol. Spectr. e0222023. https://doi.org/10.1128/spectrum.02220-23

Article soumis

Souguir, M., Châtre, P., Drapeau, A., François, P., Azaiez, S., Hmidi, I, Ncir, S., Lupo, A, Madec, J.-Y., Mansour, W., Haenni, M., 2023. CTX-M-15/27-positive *Escherichia coli* and VIM-2-producing *Pseudomonas putida* in free-living pigeons (*Columba livia*) in Tunisia. Journal of Global Antimicrobial Resistance (JGAR).

- **Article en co-auteure**

Ncir, S., Lupo, A., Drapeau, A., Châtre, P., Souguir, M., Azaiez, S., Madec, J.-Y., Mansour, W., Haenni, M., 2022. Back to the Origin: *bla*$_{\text{OXA-204}}$ and *bla*$_{\text{NDM-1}}$ Genes in *Shewanella spp*. from a Tunisian River. Microbiol. Spectr. 10, e0160522. https://doi.org/10.1128/spectrum.01605-22

- **Communications orales**

Souguir M, Chatre P, Drapeau A, Francois P, Ncir S, Madec J.-Y, Mansour W, Haenni M. Occurrence of multidrug resistance *Escherichia coli* and *Escherichia marmotae* in starlings in Tunisia. Journées scientifiques et doctorales de l'Anses (JSDA), octobre 2023, Paris, France.

Souguir, M., Châtre, P., Drapeau, A., François, P., Azaiez, S., Hmidi, I, Ncir, S., Lupo, A, Madec, J.-Y., Mansour, W., Haenni, M., 2023. CTX-M-15/27-positive *Escherichia coli* and VIM-2-producing *Pseudomonas putida* in free-living pigeons (*Columba livia*) in Tunisia. Journée de l'école doctorale (JEDISS) novembre 2023, Lyon, France.

- **Communications affichées**

Souguir M, Châtre P, Drapeau A, Ncir S, Madec J.-Y, Mansour W, Haenni M. High prevalence of multidrug resistance *Escherichia coli* in starlings in Tunisia. Abstract 12. Journées scientifiques et doctorales de l'Anses (JSDA) novembre 2022, Paris, France.

Souguir M, Châtre P, Drapeau A, Ncir S, Azaiez S, Madec J, -Y, Mansour W, Haenni M. Prévalence élevée d'*Escherchia coli* multi-résistants chez les étourneaux en Tunisie. Abstract AA-P32. 17ème congrès national « Microbes » de la Société Française de Microbiologie (SFM). Octobre 2022, Montpellier, France

Table des matières

Remerciements 4
Résumé 8
Abstract 9
Liste des figures 15
Liste des Tableaux 16
Liste des abréviations 17
I. Introduction 19
1. Problématique, objectifs et structure de l'étude 22
II. Revue de la littérature 25
1. Les antibiotiques : une ère glorieuse sans précédent 26
1.1. Définition 26
1.2. L'histoire des antibiotiques : de la découverte fortuite à l'avancée planifiée 26
1.3. Classification et mode d'action 28
2. La résistance aux antibiotiques, mécanisme clé de la survie bactérienne .34
2.1. Définition 35
2.2. La résistance naturelle 36
2.3. La résistance acquise 36
2.3.1. Le transfert horizontal des gènes 36
2.3.1.1. Mécanismes du transfert horizontal des gènes 37
2.3.2. Eléments génétiques mobiles impliqués dans la dissémination de la résistance 39
2.3.2.1. Les séquences d'insertion (IS) et les transposons 40
2.3.2.2. Les intégrons 41
2.3.2.3. Les ilots génomiques 42
2.3.2.4. Les plasmides 43
2.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques 46
2.4.1. Mécanismes non enzymatiques 46
2.4.1.1. Réduction de la perméabilité membranaire 46
2.4.1.2. Les pompes d'efflux 47
2.4.1.3. Modification et protection de la cible d'antibiotique 48
2.4.2. Mécanismes enzymatiques : destruction de la molécule d'antibiotique 50
2.4.2.1. Les β-lactamases 50

2.4.2.2. Les inhibiteurs de β-lactamases 58
3. Le concept « One Health » : l'union pour un monde en meilleure santé 59
3.1. Définition 59
3.2. Origine du concept 60
3.3. Principe et objectifs 60
3.4. La résistance aux antibiotiques dans le contexte One Health 62
3.5. *Escherichia coli* - indicateur de la résistance aux antibiotiques dans le concept "One Health"… 63
4. Surveillance des usages et de la résistance aux antibiotiques 65
4.1. Consommation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire 65
4.1.1. Usage des antibiotiques en médecine humaine 65
4.1.2. Usage des antibiotiques en médecine vétérinaire 66
4.2. Surveillance de la RAM 68
4.2.1. Surveillance de la RAM chez l'Homme 68
4.2.2. Surveillance de la RAM chez les animaux 72
4.2.3. Surveillance de la RAM en Tunisie 75
5. Epidémiologie moléculaire de la résistance aux antibiotiques : trajectoires mondiales des BLSE/AmpC à travers les différents écosystèmes 75
5.1. Epidémiologie mondiale des BLSE/ AmpC en clinique humaine 76
5.1.1. En Afrique du Nord 77
5.1.2. En Tunisie 78
5.1.3. En Europe 79
5.2. Epidémiologie mondiale des BLSE/AmpC dans l'environnement hydrique 80
5.2.1. En Afrique du Nord et en Tunisie 81
5.2.2. En Europe 82
5.3. Epidémiologie mondiale des BLSE/AmpC dans le bétail et les animaux domestiques 82
5.3.1. En Afrique du Nord 83
5.3.2. En Tunisie 83
5.3.3. En Europe 84
5.4. Epidémiologie moléculaire de la résistance aux antibiotiques dans la faune sauvage. 87
5.4.1. En Afrique 89
5.4.2. En Europe 91
6. Ailes porteuses : le rôle des oiseaux sauvages dans la dissémination mondiale de la résistance aux antibiotiques 92

6.1. Les oiseaux sauvages : un réservoir important de bactéries résistantes et de gènes de résistance 92
6.1.1. Réservoir de gènes de résistance aux céphalosporines de dernière génération.. 92
6.1.2. Réservoir de gènes de résistance aux carbapénèmes 94
6.1.3. Réservoir des gènes de résistance à la colistine 95
6.2. Origine des bactéries et des gènes de résistance chez les oiseaux sauvages 96
6.3. Disséminatoin des bactéries et des gènes de résistance par les oiseaux sauvages ?. 98
7. Les espèces d'oiseaux investiguées dans cette étude 103
7.1. Les étourneaux sansonnets 103
7.1.1. Distribution géographique 104
7.1.2. Habitat et écologie 105
7.1.3. Régime alimentaire 105
7.1.4. Migration 106
7.1.5. Antibiorésistance chez les étourneaux 106
7.2. Les pigeons 107
7.2.1. Distribution géographique 107
7.2.2. Habitat et alimentation 108
7.2.3. Déplacements 108
7.2.4. Antibiorésistance chez les pigeons 109
III. Etudes expérimentales 110
1. Etude de la résistance aux antibiotiques chez les étourneaux 111
1.1 Résumé 111
1.2 Article 115
2. Etude de la résistance aux antibiotiques chez les pigeons 116
2.1 Résumé 116
2.2 Article 120
IV. Discussion générale 146
1. Etude des étourneaux en Tunisie 149
1.1 Résistances aux céphalosporines de dernières générations sur les trajets migratoires 149
1.2 Identification de *E. marmotae*, une bactérie originaire de la faune sauvage ? 153
1.3 Résistance chez les étourneaux : des origines multiples et mélangées 156

2. Etude des pigeons dans la région de Sousse et Monastir 157

V. Conclusions et perspectives 161

Conclusions 162

Perspectives 164

Références bibliographiques 168

Annexe 204

Liste des figures

Figure 1. Chronologie des principales découvertes des molécules d'antibiotiques. 28
Figure 2. Structure du peptidoglycane 29
Figure 3. Structure des antibiotiques β-lactamines 31
Figure 4. Schéma illustrant les différents mécanismes d'action des antibiotiques 33
Figure 5. Chronologie des principales découvertes en termes d'antibiotiques et des rapports sur l'émergence des souches résistantes aux antibiotiques.....35
Figure 6. Mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert horizontal des gènes**.** 37
Figure 7. Différents éléments génétiques mobiles : plasmides, transposons et intégrons, impliqués dans le THG, représentant les principaux moteurs de la dissémination de la RAM 39
Figure 8. Illustration des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques. 46
Figure 9. Arbre phylogénétique de la famille d'enzyme CTX-M.....53
Figure 10. One Health : une approche globale, multisectorielle, et holistique pour un monde unique plus sain 61
Figure 11. Prévalence mondiale d'*E. coli* résistants aux C3G en 2019.....69
Figure 12. Nombre de décès dans le monde attribuables ou associés à la résistance bactérienne aux antibiotiques, par agent pathogène, 2019.....70
Figure 13. Taux de consommation d'antibiotiques dans le monde pour l'année 2018, avec intervalles d'incertitude en dose définie journalière (DDJ) par 1000 habitants par jour 66
Figure 14. Epidémiologie mondiale des CTX-Ms durant la période 2009-2017 (données hospitalières et communautaires) 77
Figure 15. Epidémiologie des BLSE et AmpC céphalosporinases chez la faune sauvage en Afrique.....90
Figure 16. Epidémiologie des BLSE et AmpC céphalosporinases chez la faune sauvage en Europe 91
Figure 17. Répartition géographique et propagation potentielles des carbapénèmases parmi les populations d'oiseaux sauvages dans différents pays dans l'étude de Ahlstrom et al. La couleur jaune représente les souches ayant la même ST, la couleur orange indique la présence du même gène de carbapénèmase. La couleur rouge signifie que des souches avec le même contexte génétique immédiat du gène de carbapénèmase ont été isolées à partir de lieux ou d'événements d'échantillonnage différents 100
Figure 18. Schéma illustrant les voies de transmission des bactéries multi-résistantes entre les animaux d'élevage, la faune sauvage, l'environnement aquatique et les humains. Les oiseaux sauvages migrateurs sont présentés comme des vecteurs potentiels de dispersion, transportant des bactéries résistantes et des gènes de résistance via leurs fèces entre ces différents écosystèmes.....102
Figure 19. Carte de la distribution de l'espèce étourneau sansonnet dans le monde. 104
Figure 20. Aire de distribution des pigeons biset dans le monde.....108
Figure 21. Carte montrant les sites où les étourneaux ont été capturés en Tunisie.....112
Figure 22. Carte montrant les mouvements migratoires des étourneaux 150

Liste des Tableaux

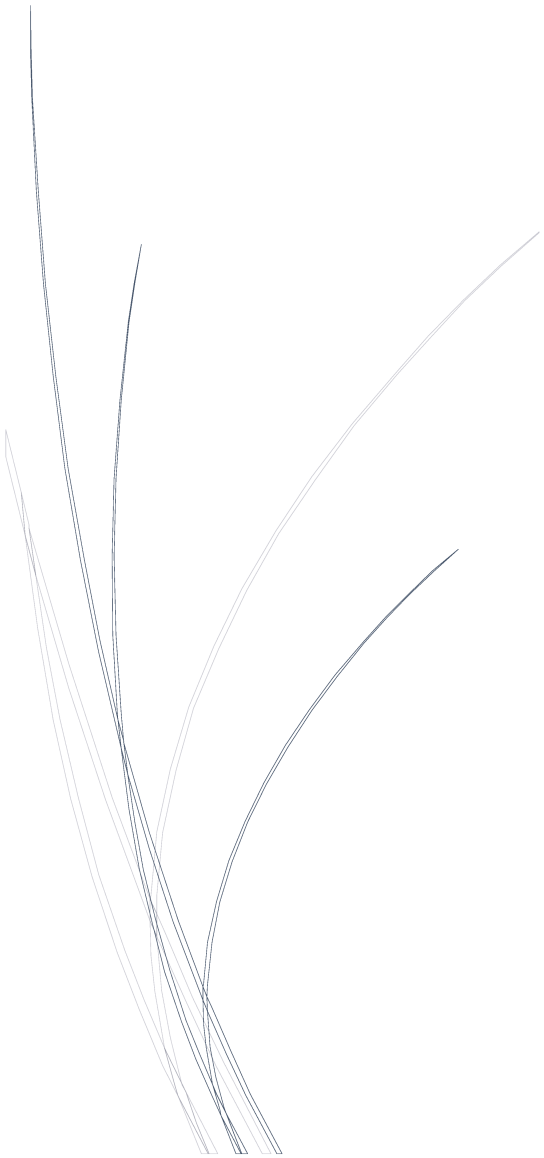
Tableau 1. Classification des principales molécules de β-lactamines. 30
Tableau 2. Classification des principaux plasmides selon leurs groupes d'incompatibilité et leur type MOB 45
Tableau 3. Classification des β-lactamases selon Ambler 51
Tableau 4. Caractéristiques de toutes les souches isolées à partir des pigeons. 139
Tableau 5. Matrice des distances alléliques entre les isolats de *E. coli* collectés à partir des pigeons dans notre étude et ceux isolés à partir d'un produit de la mer en Tunisie.....142
Tableau 6. Matrice des distances alléliques entre les isolats d'*E. coli* ST206 porteurs du gène $bla_{\text{CTX-M-27}}$ collectés dans cette étude et ceux isolés au Vietnam et au Nigéria. 143
Tableau 7. Contrôles qualités du séquençage du génome entier de toutes les souches isolées et séquencées. 145

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ARNr	Acide Ribonucléique de ribosome
ARNt	Acide Ribonucléique de transfert
ACT	β-lactamase de type AmpC
BGN	Bacilles à Gram Négatif
BLSE	β-lactamases à spectre étendu
BMR	Bactérie Multi-résistante
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme - Société Française de Microbiologie
CAFO	Concentrated Animal Feeding Operation
CAESAR	Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance
CGE	Center for Genomic Epidemiology
cgMLST	core genome Multi Locus Sequence Typing
CTX-M	Céfotaximase-Muenchen (enzyme de type BLSE)
C1G	Céphalosporines de 1ème génération
C2G	Céphalosporines de 2ème génération
C3G	Céphalosporines de 3ème génération
C4G	Céphalosporines de 4ème génération
CMY	β-lactamase hydrolysant les céphamycines (enzyme de type AmpC)
DHA	β-lactamase de l'hôpital Dhahran en Arabie saoudite (enzyme de type AmpC)
DR	Direct Repeats
ECDC	European Centre of Disease and Control
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EARS-VET	European Antimicrobial Resistance Surveillance network in Veterinary medicine
EU/EEA	European Union (EU)/European Economic Area (EEA)
FAO	Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture
GLASS	Global Antimicrobial Resistance and use Surveillance

ICE	Elément Integratif et Conjugatif
IME	Elément intégratif mobilisable
IS	Insertion Sequence
IR	Repetition inverse (inverted repeat)
IRL	Inverted Repeat Left
IRR	Inverted Repeat Right
Int	Integrase
IMP	Imipenemase (métallo- β-lactamase)
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (enzyme de type carbapénémase)
LPS	Lipopolysaccharide
MBL	Métallo-β-lactamase (enzyme de type carbapénémase)
mcr	gène de résistance à la colistine
NDM	New Delhi métallo- β-lactamase (enzyme de type carbapénémase)
OMSA	Organisation mondiale de la santé animale (anciennement OIE)
OMS	Organisation mondiale de la santé
OHHLEP	One Health High Level Expert Panel
OXA-48	Oxacillinase (enzyme de type carbapénémase)
pb	paire de bases
PLPs	Protéines liant la pénicilline
pAmpC	plasmid-mediated AmpC β-lactamase
RAM	Résistance aux antibiotiques
PNUE	Programme des Nations unies pour l'environnement
PRFI	Pays à Revenues Faibles ou Intermédiaires
ST	Séquence Type
SHV	Sulfhydryl variable (enzyme de type BLSE)
SGI1	Ilot génomique Salmonella1
TEM	Temoniera (enzyme de type BLSE)
THG	Transfert horizontal des gènes
Tn	Transposon
VIM	Verona Integron Métallo-β-lactamase (enzyme de type carbapénémase)

I. Introduction



Depuis leur première découverte en 1928, les antibiotiques ont transformé radicalement la manière dont les maladies infectieuses sont traitées, en sauvant des millions de vies à travers le monde. Cependant, ces molécules miraculeuses ont été confrontées rapidement à un défi grandissant : la résistance aux antibiotiques (RAM). Bien que ce phénomène soit un processus naturel, l'utilisation excessive et non contrôlée d'antibiotiques en médecine humaine, mais aussi en médecine vétérinaire ainsi que dans l'agriculture, a engendré une pression de sélection sur les bactéries commensales et pathogènes et a favorisé la prolifération de bactéries résistantes aux antibiotiques à une échelle mondiale. La RAM est désormais reconnue comme une menace majeure pour la santé publique mondiale, engendrant des taux de mortalité, de morbidité et des coûts économiques considérables (Despotovic et al., 2023).

Si la récente pandémie de COVID-19 a occasionné d'innombrables décès et révélé de façon brutale la vulnérabilité des systèmes de santé, la RAM continue quant à elle, sans bruit, d'engendrer environ 700 000 décès annuels à l'échelle mondiale (Brogan and Mossialos, 2016). En 2019, 1.27 millions de morts ont été attribués directement à la RAM (Murray et al., 2022). D'ici 2050, selon les estimations et si aucune mesure n'est prise, le nombre de décès annuels pourrait même s'élever jusqu'à 10 millions (O'Neill, 2014). Cette progression silencieuse de la RAM est souvent décrite comme un "tsunami silencieux", capable de submerger les progrès médicaux et les systèmes de santé.

Les données scientifiques actuelles ont mis en lumière les liens profonds entre la santé humaine, animale et environnementale. Il est désormais clair que la RAM est un problème complexe qui ne peut clairement pas être attribué à un secteur unique, étant donné les interactions multiples entre les bactéries présentes chez les humains, les animaux et l'environnement. Ces interactions au sein de la triade « Homme-animal-environnement » créent des voies complexes par lesquelles les bactéries résistantes se propagent. Lutter contre la RAM nécessite donc une approche globale et holistique nommée « concept One Health » ou également « Global Health ». Cette approche permet de mieux comprendre ces interactions et d'identifier les points d'intersection où les bactéries résistantes peuvent disséminer entre les différents écosystèmes. Ainsi, il est essentiel de comprendre le rôle de tous les acteurs, y compris la faune sauvage, dans la propagation de la RAM.

La faune sauvage, en particulier les oiseaux, apparait à la lumière des données existantes comme un compartiment potentiellement clé dans la dissémination et la propagation de la RAM (Laborda et al., 2022a; Ramey and Ahlstrom, 2019). Bien qu'ils ne soient pas directement exposés aux antibiotiques, les oiseaux sauvages sont à l'interface des trois secteurs One Health et, notamment par leur contact avec des environnements anthropisés, pourraient acquérir des déterminants de résistance d'origine humaine. Les oiseaux sauvages, en raison de leurs mouvements migratoires, ont attiré l'attention en tant que sentinelles, réservoirs et vecteurs potentiels de bactéries et de gènes de résistance d'intérêt clinique majeur. Leurs déplacements à travers des environnements variés favorisent la dynamique d'acquisition/dissémination des gènes de résistance sur de longues distances et même entre les continents, ouvrant ainsi de nouvelles voies de transmission de la RAM. Face à cette réalité, il est crucial de mener des études d'épidémiologie moléculaire et de génomique pour mieux comprendre les voies d'acquisition et de propagation de la RAM, afin de pouvoir proposer des interventions ciblées permettant de limiter cette propagation.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse visant à (i) identifier les bactéries résistantes colonisant le microbiote intestinal d'oiseaux migrateurs sauvages (étourneau sansonnet) et d'oiseaux péri-domestiques (pigeon biset) capturés dans différentes villes de Tunisie, et (ii) de caractériser les gènes de résistance et leurs supports génétiques, par des approches de culture et de génomique. Il s'agit du premier état des lieux de la contamination des oiseaux sauvages en Tunisie : il prouve que ces oiseaux sont porteurs de gènes de résistance d'intérêt clinique majeur, et ouvre la voie à des études d'impact à la fois sur la santé publique et les écosystèmes environnants. Ce travail de thèse questionne les routes de transmission de la RAM, notamment à travers la chaîne alimentaire et les interactions avec les animaux domestiques et l'environnement. Les questions ouvertes par ce travail dépassent le cadre de l'avifaune et montrent la nécessité d'une approche multidisciplinaire et globale dans le cadre du concept "One Health" pour réduire à l'avenir le fardeau de la RAM.

1. Problématique, objectifs et structure de l'étude

Au fil des années, des efforts considérables ont été déployés pour comprendre et surveiller la RAM chez l'Homme. Une attention particulière a également été accordée aux animaux d'élevage, en raison de leur rôle potentiel dans la transmission des gènes de résistance. Cependant, notre compréhension de la RAM reste lacunaire, et il existe peu d'études approfondies sur la faune sauvage.

Dans un monde dans lequel les mouvements migratoires, les interactions entre les différentes espèces animales ainsi que les échanges de bactéries ne connaissent pas de frontières, il est important de comprendre comment la RAM diffuse dans la faune sauvage et quel en est par la suite l'impact sur la santé humaine et animale. L'objectif de cette thèse était d'étudier la RAM chez les oiseaux sauvages en Tunisie, un domaine de recherche encore peu exploré dans notre pays. Il a été décidé de se focaliser sur deux espèces aviaires spécifiques et aux caractéristiques différentes : les étourneaux (*Strunus vulagris*) et les pigeons communs (*Columba livia*). Les étourneaux sont des oiseaux migrateurs voyageant entre l'Europe et l'Afrique du Nord. Ils migrent en colonies importantes (de quelques centaines d'individus à des centaines de milliers) et vont s'installer dans les oliveraies tunisiennes, où ils sont chassés pour la consommation humaine. Cette situation nous est apparue comme particulièrement intéressante en terme de transmission potentielle de la RAM, à la fois par la concentration de ces animaux venus de pays lointains, et par le risque de contamination par voie alimentaire. Les pigeons sont quant à eux des oiseaux péri-domestiques, soumis à la pression anthropique ou de leur milieu de vie, qui pourraient être des réservoirs de gènes de résistance. Nous avons donc choisi d'étudier d'une part une population de pigeons vivant en ville, aux alentours de l'hôpital universitaire, et d'autre part une autre population vivant sur des fermes agricoles élevant des animaux destinés à la consommation.

Concernant le choix des bactéries et des résistances à étudier, nous nous sommes alignés sur les principes de la surveillance "One Health" en mettant l'accent sur la recherche des *E. coli* producteurs des BLSE. Ils sont aujourd'hui considérés comme l'indicateur majeur du fardeau de la RAM, utilisés dans un grand nombre d'études d'épidémiologie moléculaire et recommandés par l'OMS dans son protocole de surveillance intégrée Tricyle (Anjum et al., 2021a; World Health Organization, 2021),

ce qui garantit une bonne comparabilité des données générées mondialement. Cependant, nous avons également élargi notre champ d'étude pour inclure d'autres Enterobacterales résistantes aux céphalosporines de dernière génération et aux carbapénèmes reconnaissant ainsi l'importance d'une approche globale pour comprendre la RAM.

Tous les isolats étudiés dans le cadre de ce travail de thèse ont été caractérisés phénotypiquement par antibiogramme en milieu gélosé, et leur génome entier a été ensuite séquencé. Cette approche génomique nous a permis premièrement de déterminer tous les gènes de résistance présents dans ces bactéries, et ainsi d'identifier certaines résistances d'intérêt, comme par exemple la résistance à la fosfomycine conférée par le gène *fosA3* chez les étourneaux que nous n'aurions pas soupçonnée puisque nous ne testons pas cette molécule. Les données génomiques ont également permis d'évaluer l'importance de la dissémination clonale dans les populations d'oiseaux qui vivent en colonies parfois nombreuses, et de déterminer la proximité génétique des isolats collectés, entre eux et par comparaison avec les génomes référencés dans les bases de données publiques. Cette analyse nous a par exemple montré que le clone *E. coli* ST8149 semble avoir disséminé assez largement dans divers environnements comme des produits de la mer, des cafards et les pigeons. Finalement, nous avons caractérisé les plasmides porteurs de gènes de résistances aux céphalosporines de dernières générations (BLSE, AmpC) par séquençage long-read, ce qui a mis en évidence d'une part la transmission de plasmides de *E. coli* à *E. marmotae*, et d'autre part le succès épidémique de certains plasmides comme IncHI2/pST3-CTX-M-14 chez les étourneaux, ou IncF/F- :A- :B53 chez les pigeons en Tunisie.

La revue bibliographique présentée ci-dessous s'articule en plusieurs axes. Premièrement, dans les sections II.1 et II.2, les mécanismes clés de la résistance bactérienne sont présentés de manière approfondie. Deuxièmement, la section II.3 décrit le concept "One Health", en prenant soin de souligner ses objectifs et son rôle important dans la compréhension de la dynamique de la propagation de la RAM à l'échelle mondiale. Troisièmement, la section II.4, décrit les facteurs majeurs contribuant à la dissémination de la RAM tout en mettant en lumière l'impact de la consommation excessive des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire sur le fardeau de ce phénomène dans ces secteurs, ainsi que l'importance des systèmes

de surveillance mondiaux et nationaux dans la lutte contre la RAM. Les aspects épidémiologiques mondiaux de la RAM dans la triade Homme-animal-environnement sont résumés dans les sections II.5 et II.6, ce qui aide à la mise en perspective des résultats obtenus dans ces trois secteurs. Un accent particulier est mis sur les oiseaux sauvages, qui représentent le cadre général dans lequel s'inscrit cette étude. Finalement, la section II.7 donne tous les éléments nécessaires à la connaissance des deux espèces d'oiseaux étudiées, à savoir les étourneaux et les pigeons. Suite à la présentation des études expérimentales réalisées dans le cadre de cette thèse (section III), les résultats sont discutés plus largement que ne le permettent les formats concis des articles scientifiques (section IV), en abordant les origines potentielles de l'acquisition de ces résistances dans ces environnements écologiques, ainsi que de leur potentielle dissémination à travers les différents écosystèmes. Finalement, la section V vient conclure ce travail en discutant les implications de ces résistances sur la santé publique, et en suggérant des pistes d'exploration pour des travaux futurs.

II. Revue de la littérature

1. Les antibiotiques : une ère glorieuse sans précédent

Parmi les avancées médicales qui ont façonné le monde moderne, les antibiotiques sont sans conteste des agents d'exception dans la lutte contre les infections bactériennes. Ils constituent l'une des plus grandes découvertes de la médecine du 20ème siècle et une véritable révolution médicale qui a transformé le paysage de la santé et sauvé d'innombrables vies. De la genèse de ces molécules aux mécanismes par lesquels elles agissent, nous explorons dans ce chapitre leur importance cruciale et leur rôle indispensable dans le traitement des infections bactériennes.

1.1. Définition

En 1941, le microbiologiste américain Selman Waksman a été le premier à inventer le terme "antibiotique" pour décrire toute substance chimique naturelle produite par des micro-organismes capable d'inhiber ou de tuer les bactéries et d'autres micro-organismes (Waksman, 1947). Par la suite, Turpin et Velu (1957) ont proposé une nouvelle définition plus globale, considérant comme antibiotique *« tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à virus, des microorganismes ou même de certains êtres pluricellulaires »* (Toureche et al., 2020). Actuellement, la définition d'antibiotique est plus large et englobe des composés d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique présentant un large spectre d'action (Baran et al., 2023).

1.2. L'histoire des antibiotiques : de la découverte fortuite à l'avancée planifiée

L'utilisation de microbes qui produisent des antibiotiques pour combattre les infections microbiennes remonte à des millénaires. Il existe de solides évidences de l'utilisation de micro-organismes dans l'Égypte ancienne, en Grèce, en Chine et dans d'autres régions du monde et remontant à plus de 2000 ans (Ventola, 2015). Mais la première véritable découverte des antibiotiques a été réalisée par le médecin biologiste britannique Alexander Fleming en 1928, de manière totalement fortuite.

Alors qu'il observait ses cultures bactériennes, Fleming remarqua que la croissance des staphylocoques était inhibée autour d'un champignon, *Penicillium notatum*, présent sur son milieu agar. Ce phénomène l'a amené à isoler et identifier ce qui est aujourd'hui connu sous le nom de pénicilline G (Fleming, 1980). Cependant, malgré cette découverte prometteuse, Fleming rencontra des difficultés majeures dans la purification de la pénicilline. Ce n'est qu'en 1941 que les chimistes Ernst Boris Chain, Howard Florey, Norman Heatley et Edward Abraham ont permis de résoudre le problème de la production. Leur travaux ont permis l'isolement et la purification de la pénicilline G, ainsi que l'élaboration de techniques pour préparer efficacement des solutions pouvant être administrées aux patients (Abraham et al., 1941). L'utilisation clinique de la pénicilline a commencé en 1940 ; cependant, en dépit de son statut de premier véritable antibiotique, il s'est avéré inefficace contre de nombreuses maladies infectieuses, étant donné qu'il agit principalement sur les bactéries à Gram positif (Fleming, 1929). Le traitement des bactéries à Gram négatif (BGN) a dû attendre la découverte de la streptomycine dans le laboratoire de Selman Waksman à l'Université Rutgers en 1943 (Schatz et al., 2005). Le travail de Waksman a marqué le début de l'âge d'or des antibiotiques, s'étendant des années 1940 aux années 1960 (Figure 1). Durant cette période glorieuse, les scientifiques ont découvert de nombreuses familles d'antibiotiques, à partir desquelles ils ont développé synthétiquement de nouvelles molécules, étendant ainsi l'arsenal thérapeutique contre les infections bactériennes. De la pénicilline à la streptomycine, en passant par la tétracycline, le chloramphénicol et bien d'autres, cette période fructueuse a été témoin de la découverte et de la fabrication de nombreux antibiotiques aux modes d'action divers et au potentiel thérapeutique élargi (Baran et al., 2023)**.**

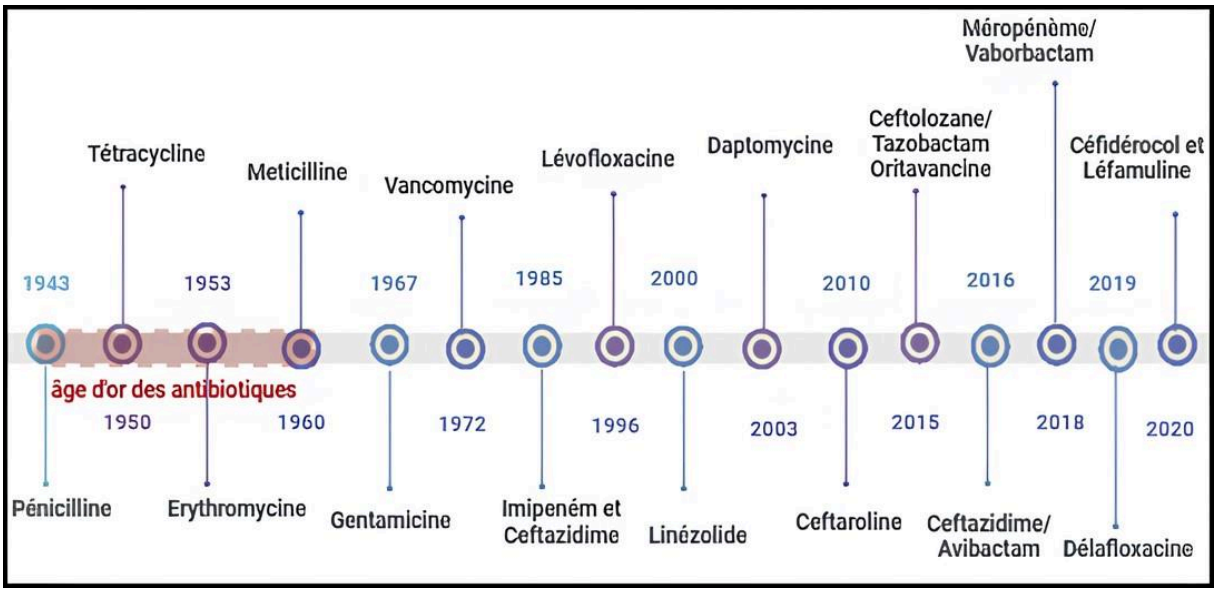


Figure 1. Chronologie des principales découvertes des molécules d'antibiotiques.

Crée par Biorender.com d'après Tang et al.(Tang et al., 2023)

1.3. Classification et mode d'action

Les antibiotiques sont généralement classés ou regroupés en fonction de leur structure chimique. Certaines classes d'antibiotiques agissent en tuant les bactéries (bactéricides) et d'autres en inhibant leur croissance (bactériostatiques). Les antibiotiques sont aussi classés selon leur mode d'action. Ils sont répartis en 5 groupes principaux : (i) inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (vancomycine, bêta-lactamines (β-lactamines), bacitracine); (ii) inhibition de la synthèse des protéines (aminoglycosides, chloramphénicol, tétracycline, linézolide); (iii) inhibition de la synthèse des acides nucléiques (rifampicine, métronidazole, quinolones, fluoroquinolones); (iv) antimétabolites (triméthoprime, sulfamides) et (v) désintégration de la membrane cellulaire (polymyxine, daptomycine) (Uluseker et al., 2021) (Figure 4).

- **Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire**

La paroi cellulaire est une structure essentielle, à la fois rigide et souple, qui donne leur forme aux bactéries et les protège de l'environnement extérieur. Elle est majoritairement composée de peptidoglycane. Ce dernier est un polymère composé de plusieurs brins glycaniques linéaires liés les uns aux autres par de courtes chaînes peptidiques. Les brins glycaniques sont de longs polymères de

disaccharides, chacun contenant un résidu d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) et de N-acétylglucosamine (GlcNAc), qui sont liés par des liaisons glycosidiques β-1,4 (8, 11, 14). Les groupes lactoyle de MurNAc sont attachés d'une manière covalente à des chaînes peptidiques qui sont généralement composées de deux à cinq résidus d'acides aminés. Dans la plupart des bactéries à Gram négatif, y compris *Escherichia coli*, la chaîne pentapeptide est constituée de L-alanine (L-ala), de γ-d-glutamate (D-glu), de l'acide mésodiaminopimélique (mDAP), et de D-alanine (D-ala)–D-ala avec une liaison isopeptidique entre D-glu2 et mDAP3 (Garde et al., 2021) (Figure 2). Ces chaînes peptidiques attachées au peptidoglycane sont reliées par des liaisons transversales catalysées par des protéines de liaison à la pénicilline (PLPs). Cette réticulation renforce la paroi cellulaire. Les β-lactamines et les glycopeptides sont des antibiotiques qui perturbent la synthèse de la paroi cellulaire (Kapoor et al., 2017).

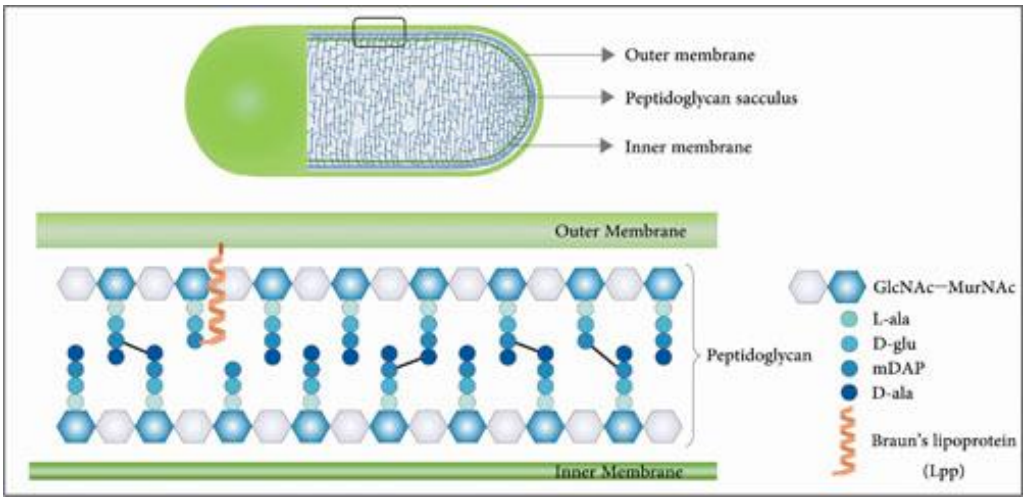


Figure 2. Structure du peptidoglycane

(Garde et al., 2021)

Les β-lactamines : une classe thérapeutique majeure

Les β-lactamines constituent la classe d'antibiotiques la plus importante et la plus largement prescrite en médecine humaine et vétérinaire. Cette classe regroupe un vaste éventail de molécules, notamment les pénicillines, les céphalosporines (classées en 5 générations), les carbapénèmes et les monobactames (Tableau 1).

Tableau 1. Classification des principales molécules de β-lactamines.

Groupe	Classe	Molécules d'antibiotiques
Pénicillines	Pénicillines	pénicilline G, pénicilline V, cloxacilline, oxacilline
	Aminopénicillines	ampicilline, amoxicilline
	Carboxypénicillines	pipéracilline, ticarcilline
Céphalosporines	Céphalosporines de 1ère génération (C1G)	céfalexine, céfalotine, cefalonium
	Céphalosporines de 2ème génération (C2G)	céfoxitine, céfamandole, céfuroxime
	Céphalosporines de 3ème génération (C3G)	céfotaxime, céfopérazone, ceftiofur, cefpodoxime, céfixime
	Céphalosporines de 4ème génération (C4G)	céfépime, céfpirome, cefquinome
	Céphalosporines de 5ème génération (C5G)	ceftaroline, ceftobiprole
Carbapénèmes		imipenème, ertapénème, méropenème
Monobactames		Aztréonam
Inhibiteurs de β-lactamases		Sulbactam, tazobactam, acide clavulanique

Structure

Les β-lactamines se caractérisent toutes par un élément structural commun, le noyau bêta-lactame, d'où leur nom. Ce noyau β-lactame est essentiel pour l'activité antimicrobienne des β-lactamines. La structure des β-lactamines peut être modifiée par l'ajout de différents groupes chimiques, ce qui permet de créer une variété d'antibiotiques avec des propriétés spécifiques (Figure 3). Ces modifications

structurales jouent un rôle clé dans la stabilité, la biodisponibilité et l'activité antibactérienne des β-lactamines (Worthington and Melander, 2013a).

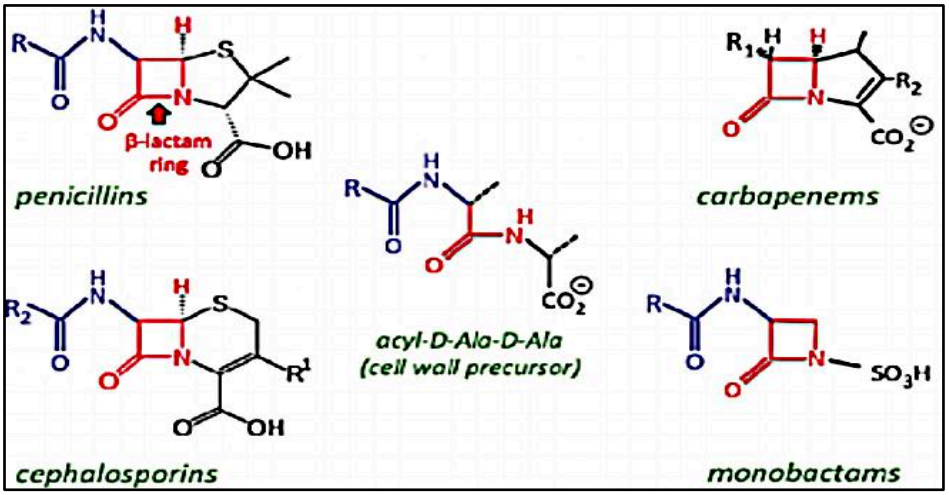


Figure 3. Structure des antibiotiques β-lactamines

(Khilnani and Khilnani, 2019).

Mode d'action

Les β-lactamines sont des analogues structurels du substrat naturel D-Ala-D-Ala, qui est reconnu par les PLPs présentes dans la paroi cellulaire bactérienne. Lorsque les β-lactamines pénètrent dans la cellule bactérienne, elles se lient de manière covalente, donc irréversible, aux PLPs par la formation d'un complexe acyl-enzyme. Ce complexe acyl-enzyme inhibe de manière spécifique l'activité transpeptidase des PLP, qui est une étape primordiale dans la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne puisqu'elle est responsable de la formation des liaisons peptidiques entre les chaînes de peptidoglycane, les principaux composants structuraux de la paroi cellulaire. En bloquant l'activité transpeptidase des PLPs, les β-lactamines bloquent la synthèse de la paroi, ce qui entraîne la disparition progressive du peptidoglycane et finalement la lyse de la cellule. En interférant avec la formation et le renforcement de la paroi cellulaire, les β-lactames exercent un effet bactéricide sur les bactéries (Worthington and Melander, 2013).

- **Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines**

La biosynthèse des protéines est catalysée par les ribosomes et les facteurs cytoplasmiques. Le ribosome bactérien 70S est composé de deux sous-unités

ribonucléoprotéiques, les sous-unités 30S et 50S. Les antibiotiques inhibent la biosynthèse des protéines par leur fixation préférentielle soit sur la sous-unité 30S, soit sur la sous-unité 50S des ribosomes (Figure 4).

Les inhibiteurs de la sous unité 30S

Les aminoglycosides sont des antibiotiques bactéricides qui interagissent avec l'ARNr de la sous-unité 30S, près du site A, et inhibent la translocation. Il en résulte un arrêt prématuré de la traduction.

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques qui inhibent la traduction. Ils agissent sur les séquences conservées de l'ARNr 16s pour empêcher la liaison de l'ARNt au site A, ce qui va empêcher l'élongation de la chaîne peptidique en cours de formation (Kapoor et al., 2017).

Les inhibiteurs de la sous unité 50S

Le chloramphénicol, les macrolides, les lincosamides, les streptogramines B et les oxazolidinones sont des inhibiteurs de la sous-unité 50S du ribosome bactérien. Le chloramphénicol se lie à la cavité de la peptide transférase de l'ARNr 23S, une composante essentielle du ribosome bactérien, et bloque ainsi la liaison de l'ARNt sur le site de liaison peptidique. Cela entraîne un arrêt complet de la synthèse des protéines dans la cellule bactérienne. Quant aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines B, ils perturbent le centre de la peptidyltransférase de l'ARNr 23S. Cette perturbation provoque un détachement prématuré de la chaîne peptidique en cours de synthèse, interrompant ainsi la synthèse des protéines. Les oxazolidinones se lient également à l'ARNr 23S du ribosome bactérien, mais leur mécanisme d'action diffère. Elles inhibent la formation du complexe d'initiation de la traduction, empêchant ainsi la synthèse des protéines (Kapoor et al., 2017).

- **Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques**

Certains antibiotiques comme le rifamycine ciblent la synthèse de l'ARN, et d'autres (les fluroquinolones) la réplication de l'ADN. Les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase bactérienne, perturbant ainsi la réplication et la transcription de l'ADN. Elles ciblent la sous-unité A de la topoisomérase II ou la topoisomérase IV en empêchant l'encapsulation et le recollage des brins d'ADN (Yoneyama and Katsumata, 2006).

- **Les antimétabolites : inhibiteurs de métabolisme de l'acide folique**

L'acide folique est indispensable à la synthèse de l'ADN et de l'ARN, ainsi qu'à la croissance et à la multiplication des bactéries. Les sulfamides et le triméthoprime sont des antibiotiques qui inhibent différentes étapes du métabolisme de l'acide folique. Les sulfamides inhibent de manière compétitive la dihydroptéroate synthase, surpassant le substrat naturel en affinité. Le triméthoprime agit plus tard dans la voie de synthèse de l'acide folique en bloquant la dihydrofolate réductase (Yoneyama and Katsumata, 2006).

- **Antibiotiques agissant sur la membrane cellulaire**

La colistine et la polymyxine B appartiennent à la classe des polymyxines, qui agissent en ciblant spécifiquement la membrane externe des BGN. Elles établissent une interaction électrostatique entre le résidu d'acide α,γ-diaminobutyrique (Dab) chargé positivement des polymyxines et les groupes phosphates chargés négativement de la membrane lipidique. Cette interaction perturbe la structure du lipopolysaccharide (LPS) et induit une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne en entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et finalement une mort cellulaire (Poirel et al., 2017).

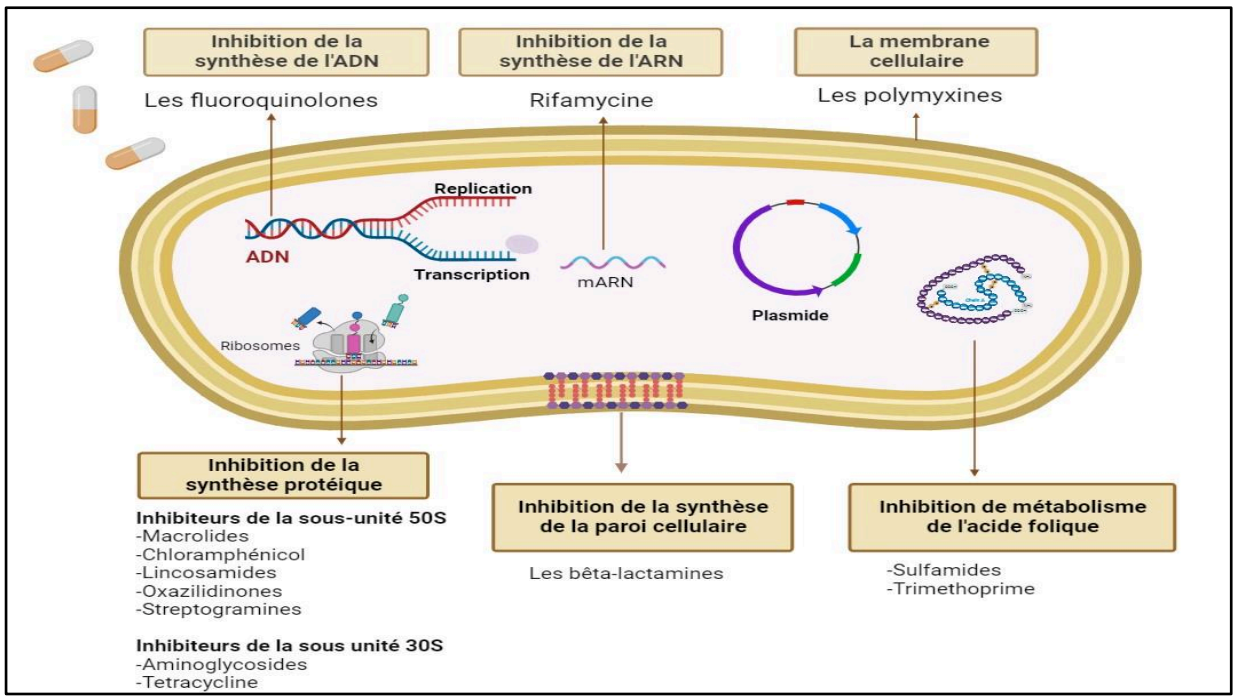


Figure 4. Schéma illustrant les différents mécanismes d'action des antibiotiques

(Créé par BioRender.com)

2. La résistance aux antibiotiques, mécanisme clé de la survie bactérienne

Malgré leur efficacité indéniable, les antibiotiques ont été confrontés à un défi grandissant au fil des décennies : la résistance bactérienne. Ce phénomène inquiétant trouve ses racines dans l'utilisation excessive et inappropriée de ces médicaments. En effet, dès 1945, Alexander Fleming avait pressenti ce problème lorsqu'il exprimait ses préoccupations lors de son discours d'acceptation du prix Nobel de médecine, où il avait conclu que " *Le moment viendra où la pénicilline pourra être achetée par n'importe qui dans les magasins. Alors il y aura le danger que l'homme ignorant puisse facilement se sous-doser et en exposant ses microbes à des quantités non létales du médicament, les rendre résistants"* [1]. (Wall, 2019). Malheureusement, ces prévisions se sont avérées exactes et, aujourd'hui, la problématique de la résistance aux antibiotiques représente une menace majeure pour la santé publique à l'échelle mondiale.

La perte d'efficacité des antibiotiques due à leur utilisation excessive et inappropriée a été qualifiée comme la "tragédie des biens communs", qui se produit "lorsque les membres d'une communauté gaspillent une ressource limitée et partagée, car chaque acteur poursuit son propre intérêt à court terme en exploitant la ressource pour un bénéfice privé". Cette analogie décrit la situation où l'utilisation non responsable des antibiotiques par des individus peut conduire à une résistance accrue des bactéries, réduisant ainsi l'efficacité de ces médicaments vitaux pour l'ensemble de la société (Jonas, 2017).

Outre l'usage inapproprié, l'absence de nouveaux développements dans la production d'antibiotiques a également contribué à l'émergence de la résistance. En effet, le manque de nouveaux antibiotiques efficaces pour traiter les infections bactériennes oblige les médecins à utiliser les mêmes molécules d'antibiotiques ou les plus largement utilisées. Cela peut favoriser la résistance bactérienne, car les

---

[1] **Texte original "***the time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant".*

bactéries ont plus de chances de développer des mécanismes de résistance contre les antibiotiques fréquemment utilisés.

Entre les années 1940 et les années 1960, 20 nouvelles classes d'antibiotiques ont été développées. Des souches résistantes sont apparues dans les cinq années suivant chaque découverte, et depuis lors la recherche et le développement d'antibiotiques par les industries pharmaceutiques a stagné (Figure 5), limitant ainsi l'arsenal thérapeutique pour lutter contre les bactéries résistantes (Smith et al., 2015).

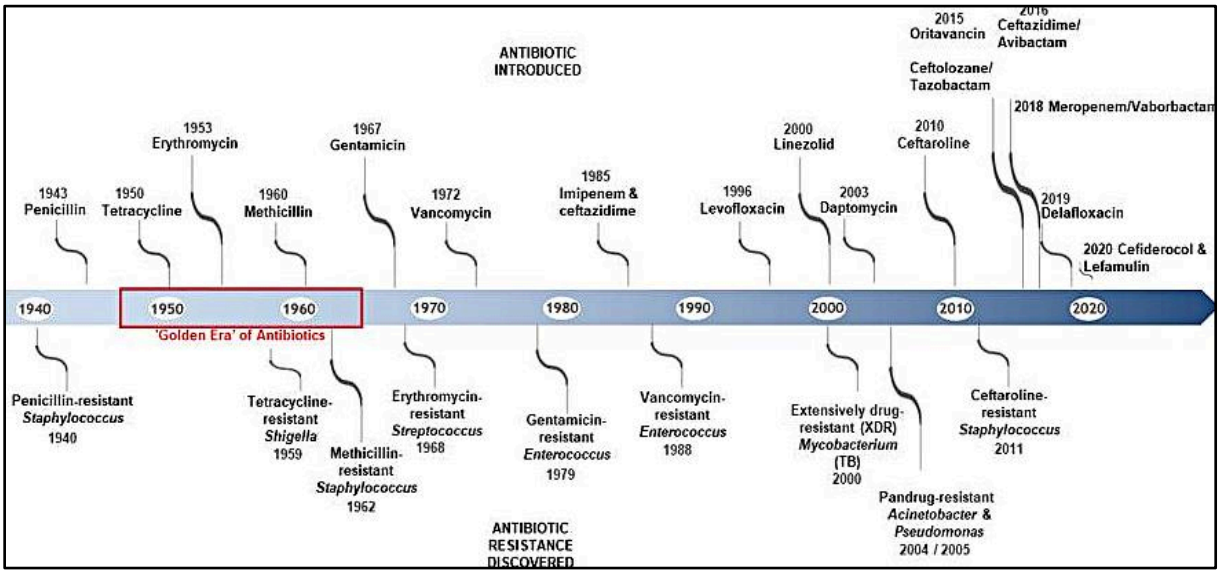


Figure 5. Chronologie des principales découvertes en termes d'antibiotiques et des rapports sur l'émergence des souches résistantes aux antibiotiques

(Tang et al., 2023).

Ce chapitre décrit les mécanismes complexes de la résistance aux antibiotiques et les supports génétiques impliqués dans sa propagation. Une analyse approfondie de ces éléments clés nous permettra de mieux comprendre la façon dont les bactéries développent leur résistance aux antibiotiques et de comprendre la dynamique de l'émergence de la RAM.

2.1. Définition

L'antibiorésistance désigne la capacité des bactéries de survivre et de se multiplier en présence d'antibiotiques qui, normalement, devraient les tuer ou inhiber leur

croissance. En conséquence, les antibiotiques perdent leur capacité à éradiquer ou à inhiber ces bactéries, rendant les traitements des infections de plus en plus difficiles et moins efficaces (WHO, 2021a). D'un point de vue clinique, des bactéries ciblées et initialement sensibles à un antibiotique développent une résistance vis-à-vis de celui-ci en cas d'utilisation prolongée ou inadéquate. D'un point de vue évolutif, les bactéries sont capables de muter et de développer des mécanismes pour échapper à l'action des antibiotiques, ce qui entraîne une perte d'efficacité de ces médicaments (Davies and Davies, 2010). La résistance aux antibiotiques peut être intrinsèque ou acquise grâce à des mutations génétiques ponctuelles ou à l'acquisition de gènes de résistance par les bactéries.

2.2. La résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un mécanisme de défense naturel présent chez toutes les bactéries d'une espèce ou d'un genre et qui leur permet de résister à certains antibiotiques grâce à des spécificités structurelles ou fonctionnelles. La résistance naturelle fait partie des caractéristiques de base des espèces/genres qui la présentent et ne peut pas disparaître. Elle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible horizontalement (d'une bactérie à une autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes). La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien (Blair et al., 2015).

2.3. La résistance acquise

La résistance acquise est un processus évolutif par lequel une bactérie qui était auparavant sensible à un antibiotique développe une capacité de résistance en raison de changements dans son matériel génétique. Ces changements peuvent être causés par des mutations ponctuelles dans les gènes présents dans le chromosome de la bactérie, affectant diverses cibles, ou par l'acquisition de nouveaux gènes provenant d'autres bactéries par transfert horizontal de gènes (THG) grâce à des structures génétiques mobiles (Holmes et al., 2016).

2.3.1. Le transfert horizontal des gènes

Le THG est défini comme le partage de matériel génétique d'une bactérie à une autre, en général de la même espèce ou d'espèces proches. Le THG représente

l'une des forces évolutives les plus importantes chez les bactéries car il permet une adaptation rapide aux pressions environnementales changeantes grâce à l'acquisition de nouvelles caractéristiques, telles que la virulence, les voies métaboliques et la RAM, codées par des éléments génétiques mobiles (Shen et al., 2022).

2.3.1.1. Mécanismes du transfert horizontal des gènes

Trois mécanismes majeurs de THG sont généralement considérés : i) la transformation naturelle ; ii) la conjugaison ; et iii) la transduction. Cependant, en 2020, un quatrième mécanisme appelé vésiduction a été proposé par Soler et Forterre (Soler and Forterre, 2020) (Figure 6).

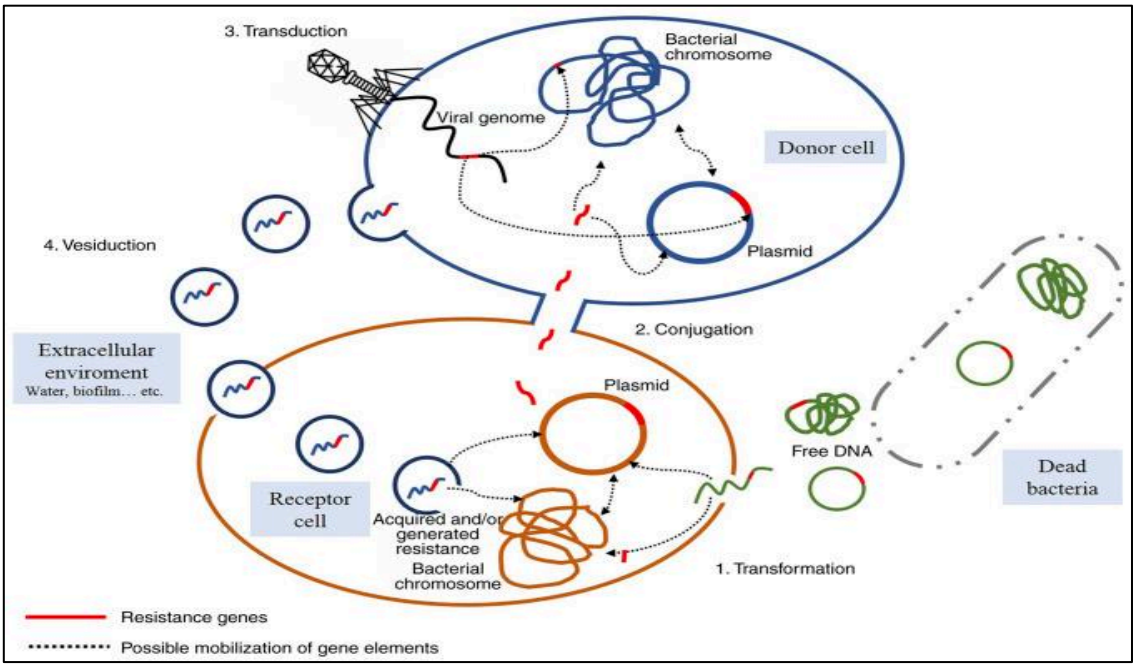


Figure 6. Mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert horizontal des gènes**.**

(González-Villarreal et al., 2022)

2.3.1.1.1. La transformation naturelle

C'est un phénomène qui implique le transfert actif de gènes à partir de l'ADN libre extracellulaire d'une bactérie lysée. Ce processus se produit lorsqu'une bactérie vivante et compétente capture cet ADN et l'incorpore dans son propre génome par

recombinaison de l'ADN. Ce mécanisme contribue à la variabilité génétique et joue un rôle clé dans l'évolution des bactéries. La transformation naturelle favorise également l'échange d'ADN entre des bactéries éloignées sur le plan taxonomique (González-Villarreal et al., 2022).

2.3.1.1.2. La conjugaison

Découverte pour la première fois chez *E. coli* par Lederberg et Tatum en 1946 (Lederberg and Tatum, 1946), ce principe implique un contact direct entre une cellule donneuse et une cellule receveuse permettant le transfert d'ADN. La conjugaison peut se produire par l'intermédiaire de deux types d'éléments génétiques : les plasmides conjugatifs et les éléments intégrés et conjugatifs, également connus sous le nom de transposons conjugatifs, qui sont intégrés dans le génome de l'hôte. Dans la plupart des bactéries, la conjugaison implique le transfert d'ADN simple brin via un système de sécrétion de type IV codé par l'élément conjugatif. Ce processus permet le transfert d'ADN, notamment des gènes de résistance, entre les cellules bactériennes (Bitto et al., 2017).

2.3.1.1.3. La transduction

C'est un phénomène qui a été mis en évidence par Zinder et Lederberg en 1952 (Zinder and Lederberg, 1952). La transduction implique des virus bactériens appelés bactériophages. Lorsque l'infection par un phage aboutit à la lyse bactérienne, certaines particules virales peuvent encapsuler des fragments d'ADN bactérien, produisant ainsi des particules transductives. Lors d'une infection ultérieure, les particules transductives injectent de l'ADN bactérien dans la bactérie hôte suivante, qui peut acquérir de nouvelles caractéristiques génétiques après avoir intégré l'ADN exogène (Lang et al., 2012).

2.3.1.1.4. La vésiduction

En 2020, Soler et Forterre ont proposé un nouveau processus dans lequel des matériaux exogènes sont donnés et/ou acquis à partir de vésicules extracellulaires. Les vésicules sont sécrétées par les bactéries à Gram positif à travers leur membrane cellulaire et par les bactéries à Gram négatif à travers leur membrane cellulaire externe. Les vésicules extracellulaires jouent un rôle important dans le

transfert de matériel génétique ainsi que dans d'autres fonctions physiologiques des bactéries. Cependant, le mécanisme exact de la vésiduction et ses implications biologiques sont encore en cours d'étude (Soler and Forterre, 2020).

2.3.2. Eléments génétiques mobiles impliqués dans la dissémination de la résistance

Les éléments génétiques mobiles correspondent à des portions d'ADN qui portent des gènes codant pour des enzymes capables de faciliter le déplacement d'autres fragments d'ADN. Ces éléments peuvent être classés en deux grandes catégories : (1) les séquences d'insertion, les transposons, les cassettes intégrons ainsi que les prophages, qui présentent la capacité de déplacer des segments d'ADN au sein d'un même génome bactérien (c'est-à-dire une mobilité intracellulaire) et (2) les plasmides et les éléments conjuguant intégratifs, qui sont en mesure de transférer des gènes entre différentes bactéries (c'est-à-dire une mobilité intercellulaire) (Partridge et al., 2018a) (Figure 7).

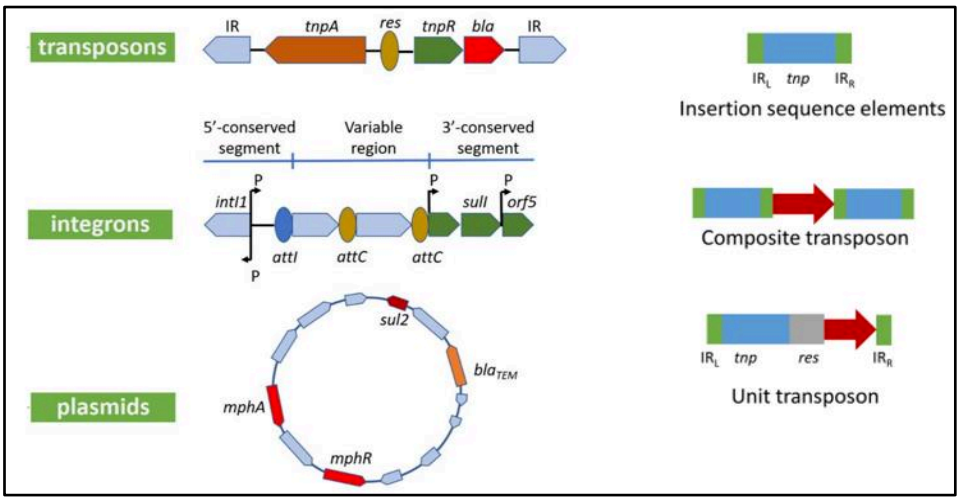


Figure 7. Différents éléments génétiques mobiles : plasmides, transposons et intégrons, impliqués dans le THG et représentent les principaux moteurs de la dissémination de la RAM

(Partridge et al., 2018b; Rozwadowski and Gawel, 2022)

2.3.2.1. Les séquences d'insertion (IS) et les transposons

Les IS sont les plus petits éléments mobiles ; ils contiennent un ou deux gènes codant l'enzyme de transposition : transposase (tnp) et qui peuvent être classés en différents groupes en fonction des motifs actifs de transposases (Figure 7). Ils peuvent se diviser en deux mécanismes de transposition : le mécanisme conservatif, où l'IS est simplement excisée du donneur et insérée dans le receveur, et le mécanisme réplicatif où l'élément transposable est transféré d'un site à un autre par réplication, tout en restant au site original ce qui conduirait à une augmentation du nombre de copies de l'élément transposable. Les extrémités des IS les plus courantes sont définies par des répétitions inversées terminales : IR (Inverted Repeat), désignées comme gauche : IRL (Inverted Repeat Left) et droite : IRR (Inverted Repeat Right) par rapport à la direction de transcription du gène *tnp*. La transposition implique la liaison de l'IR par la protéine Tnp, et de nombreux IS créent des courtes répétitions directes flanquantes : DR (Direct Repeat) lors du processus de transposition. Les IS sont généralement identifiées à partir des transposases qu'elles codent, de leurs IR et/ou de leurs DR. Les IS peuvent déplacer des gènes de résistance en faisant partie d'un transposon composite. Ce transposon composite est une région délimitée par deux copies d'un même IS ou d'IS apparentées, et il peut se déplacer en tant qu'unité unique. Ce mécanisme permet aux gènes de résistance de se déplacer au sein du génome bactérien, entre les chromosomes et des plasmides ou entre des éléments génétiques mobiles (Peirano and Pitout, 2019a). Parmi les IS, les plus impliquées dans la dissémination de la résistance chez les BGN, on trouve les éléments IS*26* et les éléments apparentés de la famille des IS*6* (IS*257* et IS*1216*). Ils sont capables de se déplacer en tant qu'unités mobiles appelées transposons composés. Un autre élément appelé IS*Ecp1* (appartenant à la famille IS*1380* et codant pour une DDE-type transposase), premièrement identifié chez *E. coli,* est responsable de la transposition des β-lactamases de type CTX-M. Il existe aussi l'élément IS*Apl1*, qui code pour une transposase de type DDE et a été initialement découvert chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*, une bactérie pathogène chez les porcs. Cet élément joue un rôle important dans la mobilisation du gène *mcr-1* (conférant la résistance à la colistine) (Partridge et al., 2018a).

Les unités transposons sont considérées comme des éléments plus grands que les IS, délimitées par l'IR plutôt que par une paire d'IS, et comprenant un gène de

transposase et un ou plusieurs gènes "passagers" internes, qui peuvent notamment coder une résistance aux antibiotiques (Figure 7). Les gènes de résistance sont souvent associés aux transposons de la famille Tn*3*, qui ont une IR terminale d'environ 38 pb et comprennent un gène codant pour une transposase (*tnpA*), un gène codant une résolvase (*tnpR*) et un site de résolution (*res*). La famille Tn*3* a été parmi les premières unités transposons identifiées chez les BGN (Nicolas et al., 2015). Une autre superfamille de transposons, appelée transposons de type Tn*7*, comprend des membres associés à la résistance aux antibiotiques, tels que les éléments de type Tn*7* et Tn*402* chez les BGN (Partridge et al., 2018a).

2.3.2.2. Les intégrons

Les intégrons sont des plates-formes génétiques fonctionnelles présentes chez les bactéries qui leur permettent d'évoluer rapidement en acquérant, stockant, excisant et réarrangeant des cadres de lecture ouverts appelés cassettes (Figure 7). Les intégrons confèrent aux bactéries un pouvoir évolutif en raison de la variété des fonctions codées dans les cassettes. La structure d'un intégron comprend une plate-forme stable et un réseau de cassettes variables. La plate-forme contient 3 éléments clés qui sont : le gène de l'intégrase (IntI) qui code pour une intégrase IntI, un site de recombinaison appelé site attI pour l'intégration des cassettes et un promoteur interne, nommé PC, qui permet l'expression des cassettes. Les cassettes sont des éléments circulaires non réplicatifs qui contiennent un gène sans promoteur et un second site de recombinaison appelé site attC (Escudero et al., 2015). Ces cassettes sont fonctionnelles lorsqu'elles sont intégrées dans la plate-forme et exprimées par le promoteur PC. Ce mécanisme est catalysé par l'intégrase entre les deux sites attI et attC. Plusieurs cassettes peuvent être insérées dans le même intégron ce qui aboutit à la création d'un réseau de cassettes qui peut conférer une multirésistance. À ce jour, cinq classes différentes d'intégrons mobiles (classes 1 à 5) ont été répertoriées en fonction de la séquence de leur intégrase. Parmi ces classes, les trois premières, IntI1, IntI2 et IntI3 avec leurs sites attI1, attI2 et attI3 respectifs, sont les plus répandues. Cependant, les intégrons de classe 1 restent les plus couramment présents dans les souches cliniques résistantes aux antibiotiques (Partridge et al., 2018a). Les classes 1 et 3 d'intégrons, en particulier, sont fréquemment associées à Tn*402*, tandis que les intégrons de classe 2 sont principalement liés à des dérivés de

Tn*7*. Ces trois classes ont une histoire bien établie en ce qui concerne la propagation de la multirésistance, ce qui les rend d'une importance cruciale du point de vue médical. Les classes 4 et 5 d'intégrons, en revanche, ont été identifiées en raison de leur rôle dans l'acquisition de la résistance au triméthoprime chez *Vibrio spp*. Plus précisément, elles ont été localisées respectivement dans un sous-ensemble des éléments SXT chez Vibrio *cholerae* et sur le plasmide pRSV1 *d'Aliivibrio salmonicida* (Escudero et al., 2015). La taille des casettes de gène des intégrons mobiles est généralement comprise entre 500 et 1000 pb. Il existe des super-intégrons qui ont été décrits sur le chromosome de différentes espèces de bactéries, notamment de *Vibrio cholerae* qui héberge environ 175 cassettes, représentant 3 % du génome. Ces intégrons casettes sont appelés "intégrons chromosomiques sédentaires" du fait qu'ils sont immobiles (Escudero et al., 2015).

2.3.2.3. Les îlots génomiques

Les îlots génomiques sont des groupes de gènes intégrés dans le génome des bactéries et qui semblent avoir été acquis par THG. Ces éléments génétiques peuvent s'intégrer dans le chromosome de l'hôte, être excisés et transférés à un nouvel hôte par transformation, conjugaison ou transduction. Initialement observés chez des bactéries pathogènes, ils ont été appelés "îlots de pathogénicité" en raison de la présence de gènes codant pour des toxines ou d'autres facteurs de virulence. Les îlots génomiques sont souvent nommés en fonction des propriétés qu'ils confèrent, tels que les "îlots métaboliques" qui permettent la dégradation de certaines substances, les "îlots de résistance aux antibiotiques" qui confèrent la résistance à certains médicaments, et les "îlots de symbiose" qui facilitent une association mutuellement bénéfique avec un hôte eucaryote (Ramsay et al., 2017).

Certains îlots génomiques codent leur propre excision par recombinaison spécifique du site, leur transfert par conjugaison et leur intégration, indépendamment de la spécificité d'intégration et du mécanisme de conjugaison. Ce sont les éléments intégratifs et conjugatifs, ou ICE. Les ICEs sont regroupés en 4 types distincts. Le type 1 regroupe les ICE qui se distinguent par la présence d'une intégrase de type 1 (Slattery et al., 2020) qui se retrouvent dans les génomes des Enterobacterales et des Vibrionaceae, alors que les ICEs de type 2, 3 et 4 ont été identifiés dans le génome de différentes espèces de *Vibrio* (Wozniak et al., 2009).

D'autres îlots génomiques sont mobilisables, ce sont les éléments intégratifs et mobilisables ou IMEs (Bellanger et al., 2014). Selon l'étude réalisée par Bellanger *et al.* (2014), un total de 18 ICEs et 11 IMEs porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques ont été recensés dans la littérature.

Parmi ces ilots, le plus connu est l'îlot génomique chromosomique de *Salmonella 1* (SGI1), qui a été initialement identifié dans les souches épidémiques multirésistantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium de type phage DT104 (Bellanger et al., 2014). SGI1 confère généralement une résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol/florfénicol, à la streptomycine/spectinomycine, aux sulfamides et aux tétracyclines (Cloeckaert et al., 2006). À ce jour, SGI1 a été identifié dans des isolats cliniques de divers serovars de *Salmonella enterica, Proteus mirabilis, Morganella morganii, Acinetobacter baumannii, Providencia stuartii, Enterobacter spp*, et récemment dans des *E. coli* d'origine aviaire (Cummins et al., 2020). SGI1 dépend spécifiquement des plasmides conjugatifs des groupes d'incompatibilité IncA et IncC pour être mobilisé et transféré vers de nouveaux hôtes (Huguet et al., 2020).

2.3.2.4. Les plasmides

Les plasmides constituent les principaux moteurs du THG. Ils peuvent être transférés à des taux élevés par plusieurs voies, et principalement par les mécanismes de conjugaison décrits précédemment (Rodríguez-Beltrán et al., 2021a)**.** Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires et extra-chromosomiques qui ont la capacité de se transmettre de manière autonome entre les cellules, et ils peuvent également mobiliser une partie du chromosome par un processus appelé recombinaison à haute fréquence (Hfr). Les plasmides ont la capacité d'acquérir de nouveaux gènes par le biais d'éléments génétiques mobiles tels que des transposons ou des séquences d'insertion. De plus, leur capacité à se répliquer dans un large éventail d'hôtes en fait des vecteurs importants pour la propagation de la résistance aux antibiotiques (Rozwandowicz et al., 2018).

Les plasmides sont très diversifiés. Ils diffèrent par leur taille, leur nombre de copies, leur contenu en G+C, le mécanisme de réplication, le mode de transmission, le contenu génétique et la diversité des hôtes, entre autres caractéristiques (Rodríguez-Beltrán et al., 2021b; Rozwadowski and Gawel, 2022). La méthode de classification des plasmides la plus couramment utilisée actuellement chez les Enterobacterales

est celle se basant sur les groupes d'incompatibilité (Inc)(Rozwandowicz et al., 2018). Le premier schéma de typage des plasmides a été mis au point par Datta et Hedges en 1997, qui ont défini les plasmides en fonction de leur stabilité (Inc) et quatre types d'Inc, à savoir : (i) les plasmides producteurs de pili de type F, qui sont sensibles au phage Ff (IncF); (ii) les plasmides producteurs de pili de type I, sensibles au phage Ifl (IncI); (iii) les plasmides liés à N3, sensibles au phage Ike (IncN); et (iv) les plasmides liés à RP4, sensibles au phage PRR1 (IncP) (Tableau 2). Actuellement, il existe 28 types Inc chez les Enterobacterales (Kopotsa et al., 2019).

Il existe également une deuxième classification des plasmides, qui prend en compte les différences dans les gènes *mob* qui codent pour les relaxases. Ces derniers sont des composants importants du relaxosome présents à la fois dans les plasmides conjugatifs et mobilisables. Toutes les relaxases de plasmides connus ont été réparties en six groupes. Cette classification en relaxases ou MOB ne détecte pas les plasmides de type IncR, car ceux-ci ne contiennent pas de gène de relaxase.

Il existe une forte corrélation avec le schéma PBRT (PCR based replicon typing), ce qui signifie que les plasmides de chaque type Inc ont des relaxases d'une seule sous-famille MOB. Par conséquent, une forte abondance de familles MOB spécifiques, telles que MOB_F et MOB_P, est en corrélation avec des types PBRT abondants tels que le complexe IncF, le complexe IncI1 et les plasmides de type ColE (Rozwandowicz et al., 2018) (Tableau 2).

Les plasmides peuvent être conjugatifs, c'est-à-dire coder pour les fonctions nécessaires au transfert d'ADN de cellule à cellule, en particulier à leur propre transfert. D'autres sont mobilisables, lorsqu'ils sont aidés par un plasmide conjugatif co-résident dans la cellule. En général, les plasmides mobilisables ne possèdent pas les gènes qui codent pour la machinerie nécessaire à la conjugaison (Bennett, 2008). Les plasmides de transfert contiennent des gènes de transfert qui codent pour la formation du pilus conjugal, le système de sécrétion de type IV (T4SS) et les composants du relaxosome nécessaires au traitement de l'ADN plasmidique avant le transfert. Les gènes de transfert sont généralement regroupés dans la région *tra* des plasmides conjugatifs (Shen et al., 2022).

Les plasmides peuvent également être répartis en deux groupes en fonction de leur mobilité : les plasmides à spectre d'hôte restreint, qui sont généralement transférés

au sein de la même espèce, et les plasmides à large spectre d'hôtes, qui peuvent être hébergés par différentes bactéries. Le deuxième groupe est lié à la propagation des bactéries multi-résistantes (Rozwadowski and Gawel, 2022). Une grande variété de plasmides peut être trouvée dans les isolats humains, animaux et environnementaux. Les plasmides les plus fréquemment signalés, souvent désignés sous le nom de plasmides épidémiques, sont IncF, IncI, IncA/C, IncL (précédemment désigné IncL/M), IncN et IncH. Ces plasmides sont particulièrement préoccupants car ils ont la capacité de transporter un large éventail de gènes de résistance, ce qui les rend potentiellement responsables de la dissémination rapide de la RAM dans diverses populations bactériennes (Rozwandowicz et al., 2018).

Tableau 2. Classification des principaux plasmides selon leurs groupes d'incompatibilité et leur type MOB (Rozwandowicz et al., 2018)

Type Inc	Type MOB	Taille (kb)	Nbre de copies	Transféra-bilité	Spectre d'hôtes
IncF	MOB_F	45–200	Faible	Conjugatif	Enterobacterales
IncI	MOB_P	50–250	Faible	Conjugatif	Restreint
IncK, IncB/O, IncZ	MOB_P	80–150	Faible	Conjugatif	Restreint
IncA/C	MOB_H	18–230	Faible	Conjugatif	Restreint
IncH	MOB_H	75–400	Faible	Conjugatif	Large (Enterobacterales, autres BGN)
IncP	MOB_P	70–275	Faible	Conjugatif	Large
IncL/M	MOB_P	50–80	Faible	Conjugatif	Large
IncN	MOB_F	30–70	Faible	Conjugatif	Large
Col	MOB_P	6–40	1–20	Mobilisable	N/A
IncX	MOB_P	30–50	N/A	Conjugatif	Restreint
IncR	Non	40–160	N/A	Mobilisable	Large
IncW	MOB_F	<40	Faible	Conjugatif	Large
IncQ	MOB_Q	8–14	4–12	Mobilisable	Large (Alpha, Beta, Delta, Gammaproteobacteria, Cyanobacteria)
IncT	MOB_H	<217	Faible	Conjugatif	Restreint
IncU	MOB_P	29–60	Faible	Conjugatif	Large (Alpha, Beta, Gammaproteobacteria)

2.4. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les bactéries ont démontré une remarquable capacité à développer des mécanismes de résistance face aux antibiotiques. Ces stratégies adaptatives peuvent revêtir des formes variées, allant des mécanismes enzymatiques aux mécanismes non enzymatiques. Dans cette section, nous explorons ces différents mécanismes de résistance (Figure 8).

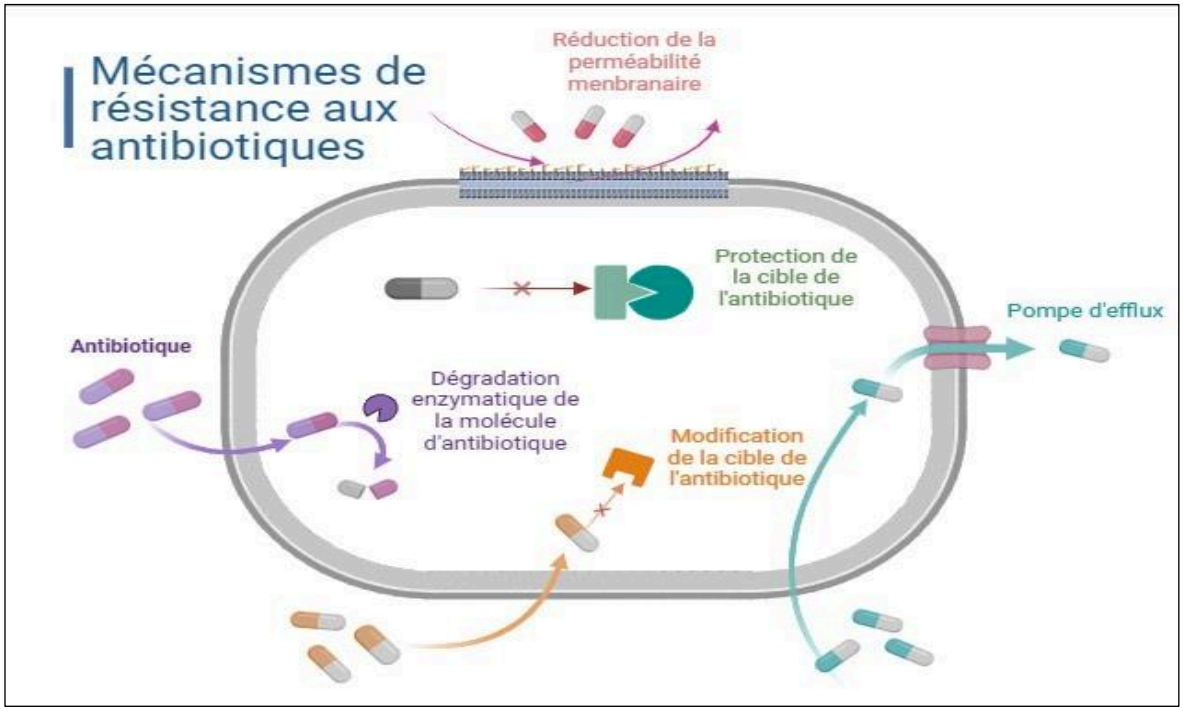


Figure 8. Illustration des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.

(Créé par BioRender.com)

2.4.1. Mécanismes non enzymatiques

2.4.1.1. Réduction de la perméabilité membranaire

Afin de pouvoir exercer leur activité, les antibiotiques ont besoin de traverser l'enveloppe de la membrane bactérienne. Ceci est particulièrement important chez les BGN qui possèdent une double membrane, avec une membrane externe jouant un rôle essentiel en assurant la protection et la fonction de barrière tout en permettant l'absorption de nutriments et l'élimination des toxines. Celle-ci contient des porines, qui sont des canaux protéiques permettant l'entrée de composés

hydrophiles de taille supérieure à 600 kDa, y compris de nombreux antibiotiques, dans la cellule bactérienne. Ces porines sont classées en familles sur la base de leur fonction et de leur architecture : les canaux généraux non spécifiques (par exemple, OmpF et OmpC) ; les canaux spécifiques au substrat (par exemple, PhoE et LamB spécifiques pour ions phosphate et aux sucres, respectivement) et les petits canaux β-barrel (par exemple, OmpA et OmpX) (Darby et al., 2023a). Des altérations de la structure des porines ont été identifiées comme des facteurs de résistance aux antibiotiques. Chez des isolats multi-résistants d'*E. coli,* des mutations dans la porine OmpC ont été identifiées, qui affectent la charge électrique du pore et, par conséquent, la perméabilité aux antibiotiques tels que la céfotaxime, la gentamicine ou l'imipenème (Lou et al., 2011). Également, la résistance aux carbapénèmes est partiellement due à des modifications des porines non sélectives OmpK35 et OmpK36 chez *Klebsiella pneumoniae* (Wong et al., 2019). Des mutations dans ces porines peuvent entraîner une constriction du pore, ce qui confère une tolérance accrue aux antibiotiques. Généralement, les porines non spécifiques, telles que OmpF et OmpC, sont caractéristiques des Enterobacterales, tandis que d'autres pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* possèdent des porines spécifiques qui permettent l'entrée de molécules dont la taille ne dépasse pas 200 Da, ce qui rend leur membrane très imperméable, notamment aux molécules hydrophiles. Dans le cas de *P. aeruginosa*, la perte de la porine OprD est la cause la plus fréquente de la résistance aux carbapénèmes dans les souches cliniques (Darby et al., 2023a). Cependant, la résistance aux carbapénèmes chez cette bactérie n'est pas forcément due à la seule perte de cette porine, mais aussi possiblement à une combinaison de mécanismes de résistance dont la présence de pompes d'efflux (Ude et al., 2021).

2.4.1.2. Les pompes d'efflux

Les pompes à efflux sont des protéines transmembranaires présentes chez toutes les bactéries et qui jouent un rôle important dans la résistance aux antibiotiques, notamment chez les BGN. Elles agissent en synergie avec la double membrane imperméable des BGN, ce qui rend ces bactéries intrinsèquement résistantes à plusieurs antibiotiques. Les pompes à efflux sont capables d'expulser une grande variété de substances toxiques, y compris des antibiotiques, à travers les

membranes bactériennes en utilisant de l'énergie (Athar et al., 2023). Les transporteurs d'efflux sont principalement regroupés dans les superfamilles suivantes : superfamille des cassettes de liaison à l'ATP (ABC), superfamille de l'extrusion de composés toxiques et multi-antibiotiques (MATE), superfamille des facilitateurs majeurs (MFS), superfamille de la nodulation de la résistance et de la division cellulaire (RND) et superfamille de la petite résistance multi-antibiotiques (SMR). Une nouvelle famille de transporteurs a été identifiée en 2015, connue sous le nom de superfamille *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* (PACE) (Huang et al., 2022). La RND constitue la famille des pompes à efflux la plus étudiée et la plus importante sur le plan clinique chez les BGN. Les pompes d'efflux RND contribuent au phénotype de multi-résistance (BMR) de tous les BGN d'importance clinique, à cause de leur large spectre de substrats (Darby et al., 2023a). Ces RND, comprennent OqxAB chez *K. pneumoniae* et *Salmonella enterica* (Li et al., 2019), AcrAB-TolC chez *E. coli* (Weston et al., 2018), AdeABC chez *A. baumannii* (Abdi et al., 2020), MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* (Lorusso et al., 2022), et TtgABC chez *P. putida* (Puja et al., 2020). Par exemple, le gène *oqxAB* est généralement trouvé sur le chromosome et/ou des plasmides, souvent flanqué d'éléments de type IS*26*, dans les isolats cliniques d'Enterobacterales et de *K. pneumoniae*. La dissémination de ce gène se fait souvent en association avec d'autres gènes de résistance aux antibiotiques tels que les *bla*$_{\text{CTX-M}}$, *rmtB* et *aac(6')-Ib*, ainsi qu'avec des gènes de virulence et de résistance aux métaux lourds (Li et al., 2019).

2.4.1.3. Modification et protection de la cible d'antibiotique

La plupart des antibiotiques se lient à une cible bactérienne spécifique avec une forte affinité, ce qui entraîne généralement l'inhibition d'une fonction cellulaire essentielle et conduit à l'arrêt de la croissance ou à la mort de la bactérie. Cependant, si la structure de la cible est modifiée ou protégée par la fixation d'éléments chimiques supplémentaires, la liaison de l'antibiotique peut devenir inefficace, ce qui confère une résistance à l'antibiotique.

Modification de la cible

La modification de la cible de l'antibiotique constitue un mécanisme important de la résistance aux antibiotiques. Par exemple, pour les antibiotiques qui ciblent la synthèse des acides nucléiques (comme les fluoroquinolones), la résistance est due

à des mutations dans des enzymes spécifiques telles que l'ADN gyrase (chez les BGN, par exemple *gyrA*) ou la topoisomérase IV (chez les bactéries Gram-positif, par exemple *grlA*). Ces mutations altèrent la structure de la gyrase ou de la topoisomérase, ce qui réduit ou élimine la capacité de substrat à se lier à ces composants. La résistance aux antibiotiques ciblant les sous-unités ribosomiques peut survenir par le biais de mutations ribosomiques (aminosides, oxazolidinones), de la méthylation de la cible du 16S ARNr par des ribosomal méthyltransférases des sous-unités ribosomiques (macrolides/lincosamides chez les bactéries Gram-positif, oxazolidinones, streptoglycosides) impliquant le plus souvent les gènes *erm*, ou par protection ribosomique (tétracyclines) (Leclercq, 2002). Ces mécanismes interfèrent avec la capacité de l'antibiotique à se lier au ribosome. Le degré d'interférence de l'antibiotique varie considérablement d'un mécanisme à l'autre. La résistance à la colistine, a également été reconnue comme résultant d'une modification de la cible. La résistance peut se produire en couvrant le LPS avec des groupements qui modifient la charge de la molécule globale et inhibent l'interaction entre l'antibiotique et sa cible (Darby et al., 2023b).

Protection de la cible

Les protéines de protection ribosomale (RPP) constituent un exemple de résistance aux antibiotiques par protection du site cible et ont été décrites chez les bactéries Gram positif et Gram négatif (Christaki et al., 2020). Les enzymes Qnr sont des protéines codées par des gènes de résistance portés par des plasmides ou par le chromosome, couramment observés chez les BGN. Elles confèrent une résistance de bas niveau aux quinolones en agissant comme un analogue de l'ADN et en réduisant l'interaction de la gyrase et de la topoisomérase IV bactériennes avec l'ADN, ce qui engendre la réduction des sites de liaison des quinolones disponibles (Aldred et al., 2014). Généralement, l'acquisition d'un gène *qnr* seul a un impact faible sur la résistance aux quinolones. Cependant, le portage d'un gène *qnr* en combinaison avec des mutations chromosomiques dans le gène *qnr* et dans le gène *gyrA* peuvent entraîner une résistance de haut niveau aux quinolones (Darby et al., 2023a).

2.4.2. Mécanismes enzymatiques : destruction de la molécule d'antibiotique

Ce mécanisme de résistance est clairement le plus répandu, notamment chez les BGN. La résistance se produit par la production d'enzymes inactivatrices ou modificatrices codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques, naturels ou acquis, qui détruisent l'antibiotique. Il constitue le mécanisme majeur conférant une résistance aux β-lactamines chez les BGN, et plus rarement chez les bactéries à Gram positif (Tooke et al., 2019a). La résistance se produit par l'activité des enzymes appelées (β-lactamases) capables d'hydrolyser le noyau β-lactam des molécules des β-lactamines.

2.4.2.1. Les β-lactamases

Les β-lactamases sont des enzymes anciennes qui prédatent largement l'usage thérapeutique des antibiotiques puisque des gènes analogues ont été identifiés dans des carottes glacières vieilles de plusieurs millions d'années (D'Costa et al., 2011).

Il existe deux grands systèmes de classification des enzymes β-lactamases : les systèmes d'Ambler et de Bush-Jacoby. Le système Ambler divise les β-lactamases en quatre classes distinctes, appelées A, B, C et D sur la base de motifs de séquence spécifiques (Tableau 3), tandis que la classification de Bush-Jacoby divise les β-lactamases en 4 groupes en se basant sur le profil d'hydrolyse du substrat (pénicilline, céphalosporine, céphalosporine à spectre étendu, carbapénème) et le profil d'inhibition (inhibition par les inhibiteurs de la β-lactamase) (Tooke et al., 2019b).

Sur le plan fonctionnel, il existe quatre classes de β-lactamases (A-D) (Tableau 3): les classes A, C et D sont des β-lactamases à sérine à site actif (serine β-lactamases ; SBL) et la classe B est un groupe hétérogène de métalloenzymes à zinc (métallo-β-lactamases, ou MBL) (Bonomo, 2017). Le nombre de β-lactamases ne cesse d'augmenter, au moment de la rédaction du présent manuscrit, la base de données des β-lactamases (BLDB, http://bldb.eu/, dernière visite le 14/09/2023) enregistrait 7996 β-lactamases distinctes (Naas et al., 2017).

Tableau 3. Classification des β-lactamases selon Ambler

(Bassetti and Garau, 2021)

	Classe d'Ambler	Enzyme	Principaux Substrats	Inhibée par
Serine β-lactamases	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Pénicillines, C1G, C2G	Acide clavulanique ou tazobactam
		TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1 TEM-50	Pénicillines, C1G, C2G, C3G, C4G, monobactames	Acide clavulanique ou tazobactam
		TEM-30, SHV-10	Pénicillines, C1G, C2G	
		PSE-1, CARB-3	Carbénicilline	Acide clavulanique ou tazobactam
		RTG-4	Carbenicilline, céfépime	Acide clavulanique ou tazobactam
		CepA	Céphalosporines à spectre élargi	Acide clavulanique ou tazobactam
		KPC-2, IMI-1, SME-1	Carbapénèmes	Acide clavulanique ou tazobactam (variable)
Métallo-β-lactamases	B	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1	Toutes les β-lactamines sauf aztréonam	EDTA
		CphA, Sfh-1	Carbapénèmes	EDTA
Serine β-lactamases	C	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, GC1, CMY-37	Penicillines, cephamycines, C3G	
	D	OXA-1, OXA-10	Pénicilline, cloxacilline, oxacilline	Acide clavulanique ou tazobactam (variable)
	D	OXA-11, OXA-15	Pénicillines, C3G, C4G	Acide clavulanique ou tazobactam (variable)
		OXA-23, OXA-48	Oxacilline, cloxacilline, carbapénèmes	Acide clavulanique ou tazobactam (variable)

2.4.2.1.1. β-lactamases de classe A

Les β-lactamases de classe A comprennent une large gamme de protéines avec des activités catalytiques très différentes, allant des pénicillinases à spectre étroit (TEM-1 et SHV-1 qui hydrolysent uniquement les pénicillines) aux β-lactamases à spectre élargi (BLSE) comme CTX-M et aux carbapénémases telles que KPC

(carbapénémase de *K. pneumoniae*). Ces enzymes de classe A sont inhibées par l'acide clavulanique et leur spectre d'activité comprend les monobactames mais pas les céphamycines (céfoxitine et céfotétan) (Munita and Arias, 2016).

Les BLSE de type TEM sont des variantes de la première β-lactamase plasmidique TEM-1, qui a été décrite au début des années 1960 (Datta and Kontomichalou, 1965). Cette enzyme a été découverte pour la première fois dans un isolat clinique d'*E. coli* à partir d'une culture sanguine d'un patient grec nommé Temoneira, d'où son nom (Medeiros, 1984). La première variante de TEM à présenter le phénotype BLSE était la TEM-3, rapportée en 1989 (Sougakoff et al, 1988). À ce jour, 243 variants différents de TEM ont été décrits, dont seul un petit nombre est de type BLSE. Généralement, les gènes codant pour les enzymes TEM-1, TEM-2 et leurs dérivés BLSE sont transportés par des transposons similaires Tn*1*, Tn*2* ou Tn*3* initialement appelées TnA (Castanheira et al., 2021). Ils se trouvent principalement sur des plasmides, en particulier du type IncA/C, bien que certains ont été identifiés sur des plasmides IncI1 (Marcadé et al., 2009).

Les β-lactamases de type SHV (pour sulfhydryl reagent variable), initialement codées de manière naturelle dans le chromosome de *K. pneumoniae*, (Livermore, 1995), sont similaires aux β-lactamases de type TEM mais avec une meilleure hydrolyse de l'ampicilline. La première BLSE était la SHV-2 qui a été décrite en 1985 chez une souche de *Klebsiella ozaenae* isolée en Allemagne (A et al., 1993). À ce jour, 250 différentes SHV ont été identifiées selon la base de données des β-lactamases (BLDB, http://bldb.eu/, dernière visite le 29/09/2023) (Naas et al., 2017).

Les variants les plus courants, SHV-5 et SHV-12, sont répandus chez les Enterobacterales. Il semble y avoir des clones particuliers en Espagne tels que (ST23/A, ST57/D), responsables de l'émergence de SHV-12 chez l'Homme et les animaux (Alonso et al., 2017) et ST131 responsable d'épidémies hospitalières (Oteo et al., 2012). Ces BLSE peuvent être trouvées soit sur des plasmides, soit sur un chromosome, flanquées par la séquence d'insertion IS*26*. Sept types de réplicons plasmidiques portent principalement ces enzymes, à savoir IncA/C, IncF, IncHI2, IncI1, IncL/M, IncN et IncX3 (Poirel et al., 2008).

Les BLSE jouent un rôle significatif parmi les β-lactamases de classe A, notamment d'un point de vue clinique. Ces enzymes ont émergé soit par des mutations

ponctuelles des β-lactamases à spectre étroit de type TEM et SHV, soit par transfert horizontal à partir d'espèces environnementales qui possédaient naturellement des β-lactamases avec un spectre étendu. C'est notamment le cas des BLSE de type CTX-M, les données actuelles suggèrent que ces enzymes ont probablement été acquises à partir de *Kluyvera spp* par THG, ce qui fait de cette bactérie environnementale leur progéniteur principal (Poirel et al., 2002). Le terme CTX-M (CTX pour céfotaxime, M pour Munich) a été introduit pour la première fois dans un rapport originaire de Munich (Allemagne), lorsque cette enzyme a été identifiée dans une souche d'*E. coli* isolée chez un nourrisson de 4 mois souffrant d'otite (Bauernfeind et al., 1990). Ces enzymes ont très rapidement émergé et ont disséminé à l'échelle mondiale, conduisant à ce que l'on appelle la « pandémie CTX-M ». Des variants de CTX-M ont été signalés chez tous les Enterobacterales ainsi que chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* Les enzymes CTX-M peuvent être regroupées en 5 groupes sur la base d'homologies de séquences : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25 (Bonnet, 2004) (Figure 9).

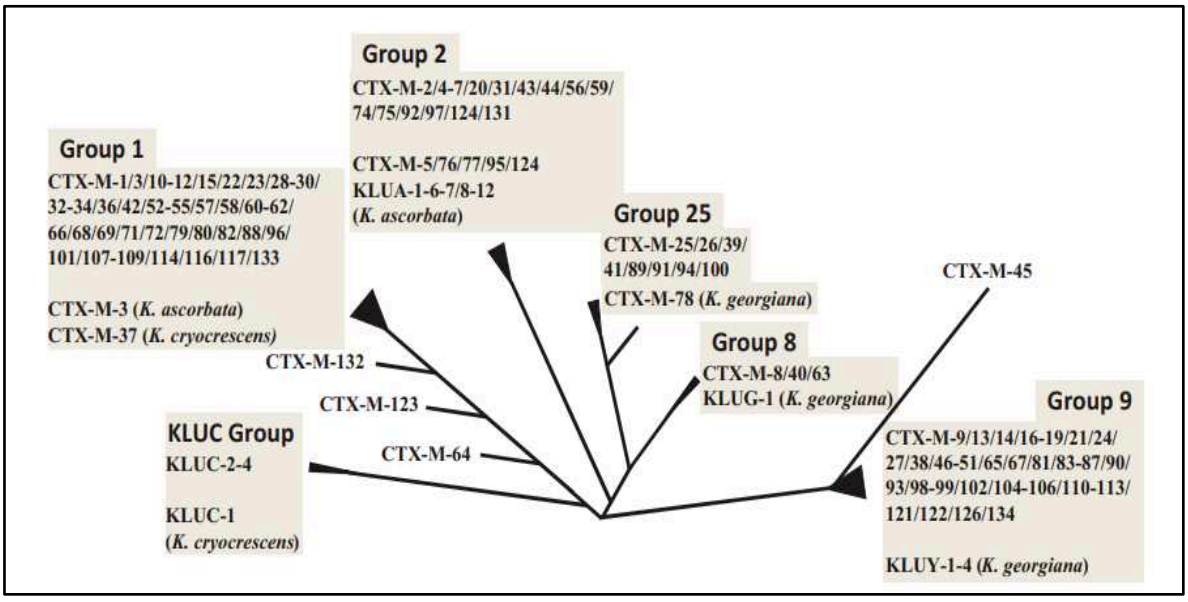


Figure 9. Arbre phylogénétique de la famille d'enzyme CTX-M

(D'Andrea et al., 2013)

Dans le groupe CTX-M-1, le sous-type CTX-M-15 est le plus couramment rapporté, suivi par CTX-M-3 et CTX-M-1. Dans le groupe CTX-M-9, CTX-M-9 et CTX-M-14 ont longtemps été les enzymes les plus répandues mais, plus récemment, la CTX-M-27 a également émergé comme une enzyme d'importance (Castanheira et al., 2021).

Quant aux CTX-M-8, elles sont surtout endémiques dans les pays d'Amérique du Sud. Initialement, les premières enzymes CTX-M présentaient une activité hydrolytique plus efficace contre le céfotaxime que contre la ceftazidime, et leur activité contre la ceftazidime était limitée. Cependant, au fil du temps, des variants de CTX-M avec une activité hydrolytique accrue contre la ceftazidime ont été identifiés. CTX-M-15, CTX-M-27 et CTX-M-9 sont des exemples importants d'enzymes CTX-M capables de dégrader efficacement la ceftazidime. Une nouvelle variante de CTX-M, CTX-M-33, qui présentait une altération en position 109 (Asp à Ser) par rapport à CTX-M-15 a été décrite chez un isolat clinique de *K. pneumoniae* par Poirel *et al* en 2019. Cette enzyme présentait une hydrolyse réduite de la ceftazidime, mais une hydrolyse importante du méropénème (Poirel et al., 2019). Les gènes codant pour les enzymes CTX-M ont été trouvés en association avec des séquences d'insertion de type IS*Ecp1*, IS*CR1* et IS*26* (Poirel et al., 2005a; Toleman et al., 2006; Varani et al., 2021), ainsi qu'avec des éléments mobiles tels que les transposons du type Tn*402* (Novais et al., 2006). Ces éléments génétiques peuvent être intégrés dans différents types de plasmides conjugatifs, leur permettant de se propager et de se disséminer (Poirel et al., 2005b). Des plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité IncF, IncI, IncN, IncHI2, IncL/M et IncK ont été identifiés comme les supports majoritaires des gènes *bla*$_{\text{CTX-M}}$. Les plasmides du groupe IncF transmettent le plus souvent les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, tandis que les plasmides IncF, IncK et IncI1 ont un lien étroit avec la propagation des gènes *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$. Des plasmides tels que IncN, IncI1, IncL/M et IncHI2, sont liés à la dissémination des gènes *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$ et *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$, respectivement. Les plasmides IncF sont limités aux bactéries de la famille Enterobacterales, contrairement à certains autres plasmides à large spectre d'hôtes, ce qui explique leur prédominance dans la diffusion des gènes *bla*$_{\text{CTX-M}}$ au sein de cette famille bactérienne (Zhao and Hu, 2013). Finalement, les gènes *bla*$_{\text{CTX-M}}$ sont de plus en plus fréquemment localisés sur le chromosome. Cette localisation chromosomique constitue un avantage significatif, car elle permet une intégration stable des gènes *bla*$_{\text{CTX-M}}$ dans le génome bactérien, même en l'absence transitoire de pression de sélection, et permet d'éviter le coût biologique engendré par la réplication des plasmides. Cette stabilité chromosomique peut contribuer à la persistance et à la propagation de la RAM chez les bactéries.

Les enzymes de classe A, y compris KPC (carbapénémase de *K. pneumoniae*), sont inhibées par le tazobactam, hydrolysent l'aztréonam, les carbapénèmes et les céphalosporines. Bien que KPC ait été détectée pour la première fois en 1996, lorsqu'elle a été isolée à partir d'une souche clinique de la bactérie *K. pneumoniae* (d'où son nom) à l'hôpital de New York, aux États-Unis (Yigit et al., 2001), elle a également été signalée dans d'autres BGN, telles que les *Enterobacter spp., E. coli, Proteus mirabilis, Salmonella spp.* et même *P. aeruginosa*. Jusqu'à présent, 22 variantes du gène *bla*$_{KPC}$ ont été décrites, principalement situés sur des plasmides portant des éléments transposables (comme Tn*4401*) ou en association avec des séquences d'insertion telles que IS*Kpn6* et IS*Kpn7* (Bush and Bradford, 2020).

2.4.2.1.2. β-lactamases de classe B

Ces enzymes sont également connues sous le nom de métallo-β-lactamases (MBL). Elles sont inhibées par la présence d'agents chélateurs d'ions tels que l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) et, comme les carbapénémases de classe A, elles sont actives contre une large gamme de β-lactamines, y compris les carbapénèmes. Contrairement aux autres classes de β-lactamases, les MBL ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Elles ont une capacité efficace d'hydrolyse des céphamycines, à l'exception de l'aztréonam, qui est relativement préservé de leur action enzymatique (Marshall et al., 2017). Il existe environ 10 types de MBL, mais la plupart de celles qui sont cliniquement importantes appartiennent à quatre familles principales : IMP (Imipénemase), VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase), SPM (São Paulo metallo-β-lactamase) et NDM (New Delhi metallo-β-lactamase). Ces enzymes ont fait leur apparition dans les années 1990 (Watanabe et al., 1991), marquées par la première détection d'une MBL de type IMP-1 dans une souche de *P. aeruginosa*, signalée au Japon. Quelques années plus tard, les MBL ont été identifiées dans des souches cliniques de différentes espèces de bactéries, notamment les Enterobacterales, les *Pseudomonas spp.* et les *Acinetobacter spp.* avant de diffuser mondialement au cours de la dernière décennie (Hammoudi Halat and Ayoub Moubareck, 2020). Ces enzymes sont devenues une préoccupation majeure en raison de leur dissémination rapide entre les différentes espèces des bactéries. Même si elles restent

principalement associées aux souches cliniques humaines, elles ont aussi été identifiées chez des animaux et dans l'environnement (Bonardi and Pitino, 2019). Les enzymes IMP et VIM acquises sont généralement codées par des cassettes de gènes dans des intégrons de classe 1 ou 3, qui peuvent être intégrés dans des transposons, ce qui permet l'insertion dans le chromosome bactérien ou sur des plasmides. En revanche, le gène *bla*$_{NDM}$ n'est pas associé à un intégron et a été observé sur des plasmides appartenant au groupe d'incompatibilité IncF, IncA/C, IncL/M, IncHI1/HI2 et IncN (Boyd et al., 2020). Il a également été associé à la présence de séquences d'insertion telles que IS*Aba125* (Nordmann et al., 2011)

2.4.2.1.3. β-lactamases de classe C

Les β-lactamases de classe C, également connues sous le nom de BLCs, AmpC ou céphalosporinases, sont caractérisées par leur large spectre, incluant les pénicillines, les céphalosporines de première génération (comme la céfalotine) et les céphamycines (comme la céfoxitine). Contrairement à certaines autres classes de β-lactamases, les AmpC ne sont généralement pas inhibées par des inhibiteurs de β-lactamases tels que l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam. Les AmpC peuvent être intrinsèques (et chromosomiques) ou acquises (et plasmidiques). Les AmpC chromosomiques sont placées sous un répresseur fort chez *E. coli* et *K. pneumoniae* et ne sont exprimées que lors de l'accumulation de mutations permettant la levée de la répression. Au contraire, l'AmpC est constitutivement active chez *Serratia, Pseudomonas, Acinetobacter, Citrobacter et Enterobacter spp*. Dans les BGN, telles que les Enterobacterales, divers événements génétiques (mutations) peuvent augmenter le niveau de résistance, en particulier aux oxyiminocéphalosporines, telles que la ceftazidime, la céfotaxime, et, dans une moindre mesure, la céfépime et le cefpirome. L'évolution de cette résistance a conduit à une nouvelle dénomination : ESAC (Extented Spectrum AmpC Cephalosporinases) pour β-lactamases AmpC à spectre étendu (Philippon et al., 2022.). La préoccupation la plus importante est que les mutations dans la séquence codante de l'AmpC peuvent contribuer à une sensibilité réduite aux carbapénèmes. Chez *P. aeruginosa* par exemple des mutants de l'AmpC ont été associés à une sensibilité réduite à l'imipénème, à la ceftazidime et au céfépime (Sawa et al., 2020).

Les AmpC acquises, appelées AmpC plasmidiques ou pAmpC, sont couramment observées chez les Enterobacterales, notamment *E. coli, K. pneumoniae, Salmonella spp, Citrobacter freundii et Proteus mirabilis* (Tekele et al., 2020). Les pAmpC ont été classées en plusieurs familles, dont CMY (hydrolysant les céphamycines), MIR (issues de l'hôpital Miriam), MOX (hydrolysant le moxalactam), LAT (hydrolysant le latamoxef), FOX (hydrolysant la céfoxitine), DHA (issues de l'hôpital Dhahran en Arabie Saoudite), ACT (AmpC intrinsèque de *Enterobacter* spp.), ACC (β-lactamase de classe C d'Ambler), et CFE (de *C. freundii*) (De Angelis et al., 2020a). Parmi ces enzymes, CMY-2 est la pAmpC la plus répandue et la plus prévalente chez les Enterobacterales, notamment *E. coli* (Seo et al., 2023). Cette enzyme est codée par le gène chromosomique *ampC* initialement trouvé chez la bactérie *C. freundii* et a été mobilisé sur des plasmides portant différents types de réplicons (IncK, IncI1, IncA/C et IncFIA-FIB) par la séquence d'insertion IS*Ecp1*. Cette séquence d'insertion fournit également le promoteur nécessaire pour une expression à haut niveau du gène *bla*$_{\text{CMY-2}}$ (Jacoby, 2009).

2.4.2.1.4. *β-lactamases de classe D*

Les β-lactamases de classe D regroupent une vaste gamme d'enzymes qui ont été initialement distinguées des pénicillinases de classe A en raison de leur capacité à hydrolyser l'oxacilline (d'où leur nom) et parce qu'elles étaient peu inhibées par l'acide clavulanique. De nombreux variants d'OXA ont été décrits, y compris des enzymes capables de dégrader les céphalosporines de troisième génération (BLSE), telles que OXA-10, OXA-2 ou OXA-11 qui sont couramment trouvées chez *P. aeruginosa* (Tawfik et al., 2012). Il existe également OXA-163, un variant intéressant d'OXA-48, car elle présente un phénotype de BLSE mais n'est pas une carbapénémase. En ce qui concerne les carbapénémases, des enzymes comme OXA-23 ou OXA-24 sont fréquemment identifiées chez *A. baumannii*. Par ailleurs, OXA-1 (identique à OXA-30) est capable d'hydrolyser le céfépime et est prévalente chez les Enterobacterales qui contiennent également le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ (Evans and Amyes, 2014a). L'OXA-48, initialement découverte en 2001 en Turquie à partir d'un isolat de *K. pneumoniae* résistant à de nombreux antibiotiques, est aujourd'hui une des carbapénémases les plus largement répandues, endémique dans le bassin Méditerranéen. Elle hydrolyse un spectre plus restreint de β-lactamines, avec une

hydrolyse cliniquement pertinente des pénicillines et de l'imipénème, mais une activité plus faible sur le méropénème (Poirel et al., 2004). Le gène *bla*$_{OXA-48}$ est souvent trouvé dans des transposons composites Tn*1999*, qui renferment des copies d'IS*1999* flanquant ce gène des deux côtés (Aubert et al., 2006). Depuis leur découverte, les gène *bla*$_{OXA-48}$ ont disséminé dans les isolats cliniques de *K. pneumoniae*, dans d'autres espèces d'Enterobacterales, et même chez *A. baumanii* (Evans and Amyes, 2014b). Leur large dissémination est due à leur localisation sur un plasmide IncL possédant une capacité de transfert particulièrement élevée.

2.4.2.2. Les inhibiteurs de β-lactamases

Pour surmonter la résistance induite par les β-lactamases, des inhibiteurs ont été développés. L'acide clavulanique a été pionnier en inhibant de manière irréversible des enzymes de classe A telles que TEM, SHV et CTX-M. Les combinaisons pénicilline-inhibiteur (amoxicilline-acide clavulanique, ampicilline-sulbactam, pipéracilline-tazobactam) ont été utilisées pour traiter les infections communautaires et nosocomiales, mais leur efficacité est restreinte à un sous-ensemble d'enzymes de classe A, qui ne comprend pas les KPC. Récemment, les diazabicyclooctanones (DBO), notamment l'avibactam, ont émergé comme nouvelles options. L'avibactam, est un puissant inhibiteur contre les classes A, C et D, utilise un mécanisme non-β-lactame réversible. Le succès de l'avibactam a inspiré d'autres DBO comme le rélébactam associé à l'imipénème. En parallèle, les boronates cycliques ont été introduits pour inhiber les β-lactamases à sérine. Le vaborbactam, en combinaison avec le méropénème, cible efficacement les infections urinaires complexes en inhibant les classes A, mais pas les enzymes OXA ni les MBL (Tooke et al., 2019a). Bien que certaines molécules chélatrices d'ions bivalents, comme l'EDTA, le captopril ou le dimercaprol, soient capables d'inactiver les MBL *in vitro*, il n'existe actuellement aucun inhibiteur de classe B pouvant être utilisé en traitement en raison de leur toxicité élevée (Mojica et al., 2022)

3. Le concept « One Health » : l'union pour un monde en meilleure santé

3.1. Définition

Le concept "One Health" a donné lieu à différentes interprétations quant à sa signification et sa mise en pratique. Ces définitions ne cessent de se diversifier dans les publications et parmi les institutions et les organisations. Une nouvelle définition globale a été élaborée récemment par le groupe consultatif : One Health High Level Expert Panel (OHHLEP) en mai 2021. Ce groupe est issu de la collaboration de 4 organisations mondiales qui sont : la FAO, l'OMSA, le Programme des Nations unies pour l'environnement (PNUE) et l'OMS (Panel (OHHLEP) et al., 2022). Leur définition est la suivante :

« One Health » ***:*** *est une approche intégrée et unificatrice qui vise à équilibrer et à optimiser durablement la santé des personnes, des animaux et des écosystèmes. Elle reconnaît que la santé des êtres humains, des animaux domestiques et sauvages, des plantes et de l'environnement au sens large (y compris les écosystèmes) est étroitement liée et interdépendante. L'approche mobilise de multiples secteurs, disciplines et communautés à différents niveaux de la société afin qu'ils travaillent ensemble pour favoriser le bien-être et lutter contre les menaces qui pèsent sur la santé et les écosystèmes, tout en répondant au besoin collectif d'eau, d'énergie et d'air propres, d'aliments sûrs et nutritifs, en prenant des mesures pour lutter contre le changement climatique et en contribuant au développement durable.*[2]

Cette définition opérationnelle vise à être holistique, à faciliter une communication transparente entre les divers secteurs et domaines d'expertise, et à fournir un soutien aux partenaires et aux États membres dans l'élaboration de leurs approches, projets et initiatives pour mettre en œuvre le concept de "One Health" (WHO, 2021b).

---

[2] ***Texte original;*** *One Health is an integrated, unifying approach that aims to sustainably balance and optimize the health of people, animals and ecosystems. It recognizes the health of humans, domestic and wild animals, plants, and the wider environment (including ecosystems) are closely linked and inter-dependent. The approach mobilizes multiple sectors, disciplines and communities at varying levels of society to work together to foster well-being and tackle threats to health and ecosystems, while addressing the collective need for clean water, energy and air, safe and nutritious food, taking action on climate change, and contributing to sustainable development*

3.2. Origine du concept

Le concept "One Health" trouve son origine au 19e siècle, lorsque Rudolf Virchow, vétérinaire allemand, a introduit le terme "zoonose" pour désigner les maladies infectieuses qui peuvent être transmises entre l'Homme et l'animal. Par la suite, Calvin Schwabe, épidémiologiste vétérinaire, a introduit le concept de « One medecine », réaffirmant la relation étroite entre la médecine humaine et la médecine animale (Schwabe, 1964).

En 2004, le concept a été repris par l'association Wildlife Conservation Society (WCS) qui a organisé, en collaboration avec l'université Rockefeller de New York, la première conférence internationale intitulée "One World, One Health : Building Interdisciplinary Bridges to Health in a Globalized World" durant laquelle les principes de Manhattan ont été établis (Wildlife Conservation Society, 2004). Depuis lors, des événements importants se sont produits, notamment l'émergence des quatre épidémies zoonotiques : le virus du Nil occidental, le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), la maladie de la vache folle et la grippe aviaire, qui ont conduit au développement et à la redéfinition de ce concept (Badau, 2021). En 2016, le 3 novembre a été désigné comme le "One Health Day" afin de sensibiliser à l'importance d'une approche multidisciplinaire pour résoudre les problèmes de santé mondiaux (Ahmad et al., 2023).

3.3. Principe et objectifs

Le principe fondamental du concept "One Health" est de reconnaître l'interconnexion entre la santé humaine, animale et environnementale (Figure 10). Il met en évidence que la santé et le bien-être des êtres humains, des animaux, des plantes et de l'environnement sont intrinsèquement liés. Cette complexité et interconnexion entre les différents compartiments exigent une approche globale, intégrée, multisectorielle, holistique et transdisciplinaire, qui permet de mieux comprendre les causes profondes et la dynamique de l'émergence, de la propagation et de la persistance des maladies (FAO;UNEP;WHO;WOAH, 2022).

.



Figure 10. One Health : une approche globale, multisectorielle, et holistique pour un monde unique plus sain.

(FAO;UNEP;WHO;WOAH, 2022)

La mise en œuvre de l'initiative "One Health" s'est traduite par l'élaboration d'un certain nombre de plans d'action nationaux et internationaux. The One Health Joint Plan of Action (2022–2026) (OHJPA), connu sous le nom *"working together for the health of humans, animals, plants and the environment",* était le dernier plan d'action global établi par les organisations quadripartites (FAO, UNEP, WHO, et WOAH) en 2022 à Rome.

Ce nouveau plan d'action global vise à atteindre principalement plusieurs objectifs tels que le renforcement des capacités de l'initiative "One Health" afin de consolider les systèmes de santé à l'échelle mondiale, la réduction de manière significative des risques associés aux épidémies et pandémies zoonotiques, qu'elles émergent pour la première fois ou qu'elles ré-émergent, le contrôle et l'élimination des zoonoses endémiques, les maladies tropicales négligées et les maladies à transmission vectorielle, qui continuent de menacer la santé publique, le renforcement de l'évaluation, la gestion et la communication des risques liés à la sécurité alimentaire.

Ce plan d'action vise ainsi à freiner la pandémie silencieuse de la RAM, et à intégrer l'environnement dans l'initiative One Health.

3.4. La résistance aux antibiotiques dans le contexte One Health

La résistance aux antibiotiques est une composante majeure de l'initiative "One Health" et une priorité critique, car elle a la capacité de se propager rapidement dans la population ainsi que dans la chaîne alimentaire, les établissements de soins de santé et l'environnement, ce qui complique la gestion de nombreuses maladies infectieuses chez l'Homme et l'animal (Tang et al., 2023). Les facteurs favorisant cette résistance sont variés et incluent l'utilisation inappropriée et excessive d'antibiotiques dans la médecine humaine et vétérinaire, les pratiques intensives d'élevage et d'agriculture, l'importation et l'exportation internationale d'animaux et de produits agricoles, ainsi que la pollution environnementale due aux rejets d'antibiotiques et de résidus pharmaceutiques. Face à ces défis, une prise de conscience politique internationale s'est instaurée dans le but de contrer la résistance aux antibiotiques. Cela s'est concrétisé par l'élaboration du premier plan d'action mondial sur la résistance aux antimicrobiens en 2015, en collaboration avec les trois organisations mondiales qui sont l'OMSA, l'OMS et la FAO (World Health Organization, 2015). Les actions menées dans le cadre de ce plan comprennent la compréhension de la résistance aux antimicrobiens à partir de la surveillance épidémiologique, le suivi de la dynamique de transmission des bactéries multi-résistantes au niveau de la triade Homme-animal-environnement, la sensibilisation, l'éducation des communautés, la prise de décisions politiques et la préparation du personnel technique à la lutte contre la RAM (Aslam et al., 2021). En intégrant ces efforts à travers le prisme du concept One Health, les gouvernements, les organisations internationales, les professionnels de la santé et les chercheurs peuvent travailler de manière concertée pour partager des connaissances, des données et des ressources. Cette approche collaborative favorise une meilleure connaissance et une gestion plus efficace des problèmes de santé complexes qui dépassent les frontières humaines, animales et environnementales. Parce que l'avenir de la santé mondiale dépend de notre capacité à collaborer au-delà des frontières disciplinaires et sectorielles et à promouvoir une vision globale et intégrée de la santé, cette approche globale nous permet de mettre en œuvre des stratégies

de prévention, de surveillance et de contrôle de la RAM qui tiennent compte des interactions entre les différentes composantes de notre écosystème. Cette approche apparaît comme une voie prometteuse pour conserver l'efficacité des antibiotiques, limiter la propagation de la RAM et préserver à long terme la santé et le bien-être de toutes les espèces vivantes dans un monde unique plus sain.

3.5. *Escherichia coli* - indicateur de la résistance aux antibiotiques dans le concept "One Health"

En 1884, Theodor Escherich, un microbiologiste allemand, amorça une étude sur les microbes intestinaux des nourrissons. Au cours de cette étude, il identifia une bactérie à croissance rapide qu'il nomma "Bacterium coli commune". Cette bactérie, aujourd'hui connue sous le nom de *Escherichia coli*, est devenue un acteur central de la recherche en biologie et en médecine (Blount, 2015.).

Le genre comprend 6 espèces (*E. coli, E. fergusonii, E. hermannii, E. albertii, E. marmotae et E. vulneris*) et 5 clades. *E. coli* est une bactérie omniprésente, habitant le tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud, y compris les humains, et peut également être trouvée dans le sol et l'eau douce (Braz et al., 2020). *E. coli* est une cause majeure de maladies diarrhéiques, de péritonite, de colite, de bactériémie et d'infections des voies urinaires qui coûtent des milliards de dollars à traiter à l'échelle mondiale et entraînent le décès d'environ 2 millions d'êtres humains chaque année (Blount, 2015.).

E. coli est l'une des espèces bactériennes les plus diversifiées sur le plan génétique et phénotypique. Moins de 6 % de son génome global est partagé entre toutes les souches d'*E. coli,* tandis que plus de 90 % sont des "gènes accessoires" variables. Cette variabilité est alimentée par sa capacité de recombinaison homologue et de transfert horizontal de gènes, créant un pool génétique presque illimité. Cependant, cette plasticité génétique complexifie les analyses phylogénétiques, écartant la notion d'un arbre évolutif conventionnel (Lagerstrom and Hadly, 2021). Les études sur le pangénome d'*E. coli* indiquent une capacité énorme à accumuler des gènes de résistance par THG (Poirel et al., 2018).

L'espèce est composée à la fois de souches commensales et pathogènes, et peut causer des maladies chez une grande variété d'animaux hôtes. L'émergence de

souches de *E. coli* à la fois virulentes (notamment des ExPEC - *Escherichia coli* Pathogène Extra-intestinal) et multi-résistantes, comme le clone de séquence ST O25b :ST131, représente un défi majeur pour la prévention et la gestion des infections à *E. coli* (Meena et al., 2023). L'espèce *E. coli* peut être divisée en 9 groupes phylogénétiques distincts (A, B1, B2, C, D, E, F, G et H) en fonction de la présence/absence de 5 gènes (*chuA*, *yjaA*, TspE4.C2, *arpA* et *trpA*). Les groupes A, B1, C et E regroupent des souches considérées comme commensales ou responsables d'infections intestinales, alors que les souches isolées d'infections extra-intestinales appartiennent le plus souvent aux groupes B2, D et F (Tenaillon et al., 2010).

E. coli, par sa distribution ubiquitaire et sa capacité à échanger des gènes de résistance par THG, devient un modèle essentiel pour la surveillance de la RAM et un indicateur de la santé environnementale dans le contexte du concept "One Health". Il fournit principalement un instantané de la dimension environnementale de la voie de transmission fécale. À l'échelle mondiale, l'OMS occupe un rôle central dans la surveillance des prévalences de la résistance aux antibiotiques grâce au Système mondial de surveillance (GLASS) qui inclut *E. coli*. L'OMS a proposé le Protocole Tricycle pour une surveillance intégrée et globale des souches d'*E. coli* productrices de BLSE chez l'Homme, les animaux et l'environnement, 'selon l'approche "One Health". En Europe, le Réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (EARS-Net) recueille des données volontaires, dont celles d'*E. coli*. L'initiative EARS-Vet vise à étendre cette surveillance à la santé animale (Anjum et al., 2021b). Toutes ces actions de surveillance, additionnées aux très nombreuses publications d'épidémiologie moléculaire ayant les *E. coli* productrices de BLSE comme indicateur, permettent l'accumulation immense de données phénotypiques et génotypiques à l'échelle mondiale, qui peuvent être comparées et recoupées afin d'émettre des hypothèses sur l'émergence et la dissémination de la RAM. Toute nouvelle étude apporte ainsi des éléments complémentaires aidant à la compréhension globale de ces voies de transmission.

Aujourd'hui, *E. coli* est un indicateur essentiel pour étudier la RAM dans le cadre du concept "One Health". Sa diversité génétique, son rôle pathogène et son ubiquité en font un microorganisme crucial pour évaluer et répondre aux enjeux mondiaux de la RAM à l'échelle mondiale.

4. Surveillance des usages et de la résistance aux antibiotiques

4.1. Consommation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire

L'utilisation inappropriée des antibiotiques demeure le principal moteur de l'émergence de la RAM (Tang et al., 2023). L'usage des antibiotiques est aujourd'hui surveillé chez l'Homme comme chez l'animal, et de nombreuses actions sont prises pour diminuer cet usage, et donc limiter la résistance.

4.1.1. Usage des antibiotiques en médecine humaine

Dans une étude à long terme visant à estimer la consommation mondiale d'antibiotiques dans 204 pays, une augmentation significative de 46 % de la consommation mondiale d'antibiotiques a été observée entre 2000 à 2018 (Browne et al., 2021). Cette étude a montré que les niveaux les plus bas sont observés en Afrique subsaharienne et les niveaux les plus élevés en Europe de l'Est et en Asie centrale. Des taux de consommation d'antibiotiques étaient aussi très élevés en Afrique du Nord et au Moyen-Orient (23,6 [IC à 95 % : 20,4-27,5] DDJ (Dose définie par jour) pour 1000 par jour), notamment en Tunisie (38,0 [IC à 95 % : 36,0-40,2] DDJ pour 1000 par jour) (Figure 11). La Tunisie était aussi le deuxième pays consommateur d'antibiotiques au monde après la Turquie, selon une étude mondiale menée sur 76 pays entre 2000 et 2015 (Klein et al., 2018). Des augmentations importantes de la consommation de fluoroquinolones et de C3G en Afrique du Nord, au Moyen-Orient et en Asie du Sud ont été rapportées. La consommation de carbapénèmes était la plus élevée dans les régions à revenu élevé (Browne et al., 2021). Selon le dernier rapport de 2022 de l'ECDC, la consommation d'antibiotiques de dernier recours, tels que les polymyxines, a augmenté de 67 % dans l'EU/EEA en médecine humaine. En dépit de la baisse totale de la consommation d'antibiotiques chez l'Homme dans l'EU/EEA de 23 % entre 2011 et 2020, en particulier pendant la pandémie de COVID-19 (où la consommation totale moyenne d'antibiotiques a diminué d'environ 18 % entre 2019 et 2020), l'utilisation relative d'antibiotiques à large spectre a augmenté. Malgré les réductions de la consommation d'antibiotique, la RAM dans les bactéries provenant des humains dans l'EU/EEA a augmenté pour

de nombreuses combinaisons antibiotiques-bactéries depuis 2011 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022a).

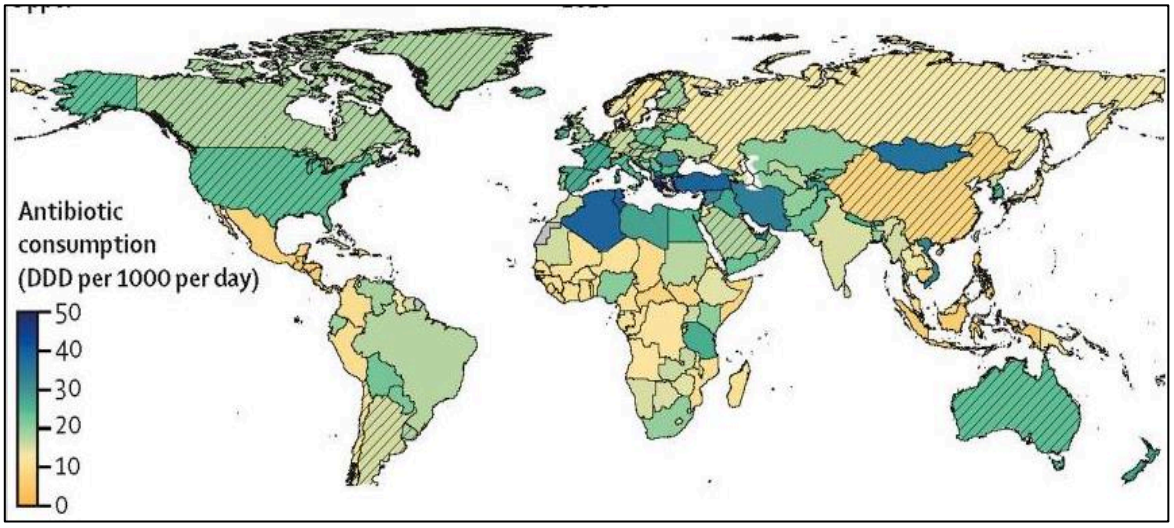


Figure 11. Taux de consommation d'antibiotiques dans le monde pour l'année 2018, avec intervalles d'incertitude en dose définie journalière (DDJ) par 1000 habitants par jour

(Browne et al., 2021)

4.1.2. Usage des antibiotiques en médecine vétérinaire

L'utilisation intensive d'antibiotiques chez les animaux d'élevage a contribué à l'émergence de la RAM, ce qui a des conséquences importantes pour la santé publique. Les bactéries résistantes aux antibiotiques d'origine animale peuvent se propager à l'Homme par l'intermédiaire de l'environnement et des produits alimentaires, et être transmises aux travailleurs agricoles par contact direct (Van Boeckel et al., 2015). La résistance bactérienne chez l'Homme était associée à la résistance chez les animaux d'élevage, elle-même liée à la consommation des antibiotiques chez les animaux. L'association positive la plus cohérente entre la RAM dans les bactéries d'origine animale et la RAM dans les bactéries d'origine humaine a été observée pour *Campylobacter spp.* selon le troisième rapport inter-agences conjoint sur l'analyse intégrée de la consommation d'agents antimicrobiens et de la présence de la RAM chez les bactéries provenant des humains et des animaux d'élevage destinés à l'alimentation (JICARA) (ECDC et al., 2021). Selon une étude

globale récente portant sur 42 pays, l'utilisation mondiale des antibiotiques (en tonnes) pour le bétail, les moutons, les poulets et les porcs en 2020 a été évaluée à 99 502 tonnes d'ingrédient actif. En se basant sur les tendances actuelles, une augmentation de 8,0 % de l'utilisation mondiale d'antibiotiques est prévue, atteignant 107 472 tonnes d'ici 2030 (Mulchandani et al., 2023). Parmi les cinq principaux consommateurs en 2020 figuraient la Chine, le Brésil, l'Inde, les États-Unis et l'Australie, représentant collectivement 58 % de l'utilisation mondiale d'antibiotiques. Cette tendance devrait perdurer jusqu'en 2030. Les tétracyclines étaient les agents les plus fréquemment utilisés en général, suivis des pénicillines et des macrolides (Mulchandani et al., 2023). Ces résultats concordent avec les données de 2019 présentées dans le 7ème rapport de l'OMSA, publié en 2023 (OMSA, 2023). Selon ce rapport, les tétracyclines, constituant 35,6 % de la quantité totale d'antimicrobiens administrés, et les pénicillines, contribuant à hauteur de 13,3 % du total sont classés dans la catégorie d'importance critique en médecine vétérinaire (AICV) conformément à la liste établie par l'OMSA. En revanche, les agents antimicrobiens figurant sur la liste de priorité la plus élevée pour la santé humaine de l'OMS, à savoir les fluoroquinolones, les C3G et C4G, représentent respectivement seulement 3,4 % et 0,6 % des quantités totales administrées en médecine vétérinaire. Selon ce rapport aussi, les données révèlent une réduction globale de 13 % des quantités d'antimicrobiens exprimées en mg/kg à l'échelle mondiale. Cette diminution est passée de 111,45 mg/kg en 2017 à 96,73 mg/kg en 2019. Elle est principalement observée dans des régions telles que l'Europe, où elle atteint -15 %, ainsi que dans les régions d'Asie, d'Extrême-Orient et d'Océanie, avec une baisse de -25 %. En contraste, une augmentation significative est constatée en Afrique (+45 %) ainsi qu'en Amérique (+5 %) (OMSA, 2023).

Toutes ces données permettent de conclure que l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire continue d'être un facteur clé dans la propagation mondiale de la RAM. Les prévisions à court terme ne laissent pas entrevoir de changement significatif dans ce scénario, car plusieurs variables, notamment l'augmentation de la demande de soins de santé, l'agriculture intensive et l'accessibilité des médicaments, contribuent toutes au maintien de ce niveau élevé d'utilisation. Cependant, la surveillance de la RAM à travers les réseaux nationaux et internationaux semble être plus importante dans la lutte contre la RAM. Ils permettent

de suivre et d'analyser les évolutions de ce phénomène, de repérer les points chauds de la résistance et de produire des données essentielles pour élaborer des politiques et stratégies de santé publique.

4.2. Surveillance de la RAM

La surveillance de la RAM est essentielle pour suivre et combattre le développement de l'antibiorésistance. Les organisations internationales telles que l'OMS, l'Union européenne ou la FAO ont mis en place des stratégies de surveillance dans les secteurs humain et animal. Cependant, il n'existe encore aucun réseau clairement structuré de surveillance de la RAM dans l'environnement, et encore moins dans la faune sauvage.

4.2.1. Surveillance de la RAM chez l'Homme

L'ère glorieuse des antibiotiques du 20ème siècle tire à sa fin, en parallèle la RAM continue d'augmenter de manière inquiétante dans le monde entier, constituant désormais une menace majeure de la santé publique et une préoccupation mondiale majeure avec des taux de morbidité, de mortalité et des pertes économiques considérables (De Angelis et al., 2020). D'après une étude menée par Lord Jim O'Neill et son équipe, la RAM est responsable du décès de 700 000 personnes par an, et ce chiffre pourrait atteindre 10 millions de décès annuels d'ici 2050 (de Kraker et al., 2016). Bien que certaines critiques aient été formulées à l'encontre de ces estimations, une récente étude internationale d'envergure publiée dans le journal The Lancet vient de renforcer ces estimations. Cette étude présente les estimations les plus complètes du fardeau de la RAM à ce jour. Elle confirme que la RAM constitue une cause majeure de décès à l'échelle mondiale. En effet, révélant que 4,95 millions de décès dans le monde ont été associés à la résistance bactérienne en 2019, dont 1,27 millions de décès attribués directement aux infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques (Murray et al., 2022). Le taux de mortalité était le plus élevé en Afrique subsaharienne occidentale, avec 27.3 décès/100 000 habitants, et le plus bas en Australasie, avec 6.5 décès/100 000 habitants. Parmi les six principaux agents pathogènes impliqués dans les décès liés à la résistance, *E.*

coli était en tête, suivi de *S. aureus, K. pneumoniae*, *S. pneumoniae, A. baumannii et P. aeruginosa* (Figure 13). Ensemble, ces pathogènes ont été responsables de 929 000 décès attribuables à la RAM en 2019. Les *E. coli* résistants aux C3G (Figure 12), *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes, *E. coli* résistants aux fluoroquinolones, *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes et *K. pneumoniae* résistantes aux C3G étaient responsables chacune de 50 000–100000 morts (Murray et al., 2022). Ces bactéries figurent sur la liste mondiale de pathogènes prioritaires, publiée par l'OMS en 2017. Cette liste comprend également des espèces de la famille des Enterobacterales résistantes aux céphalosporines de C3G (telles que les BLSE) et les Enterobacterales résistantes aux carbapénèmes (CRE) (Tacconelli, 2017).

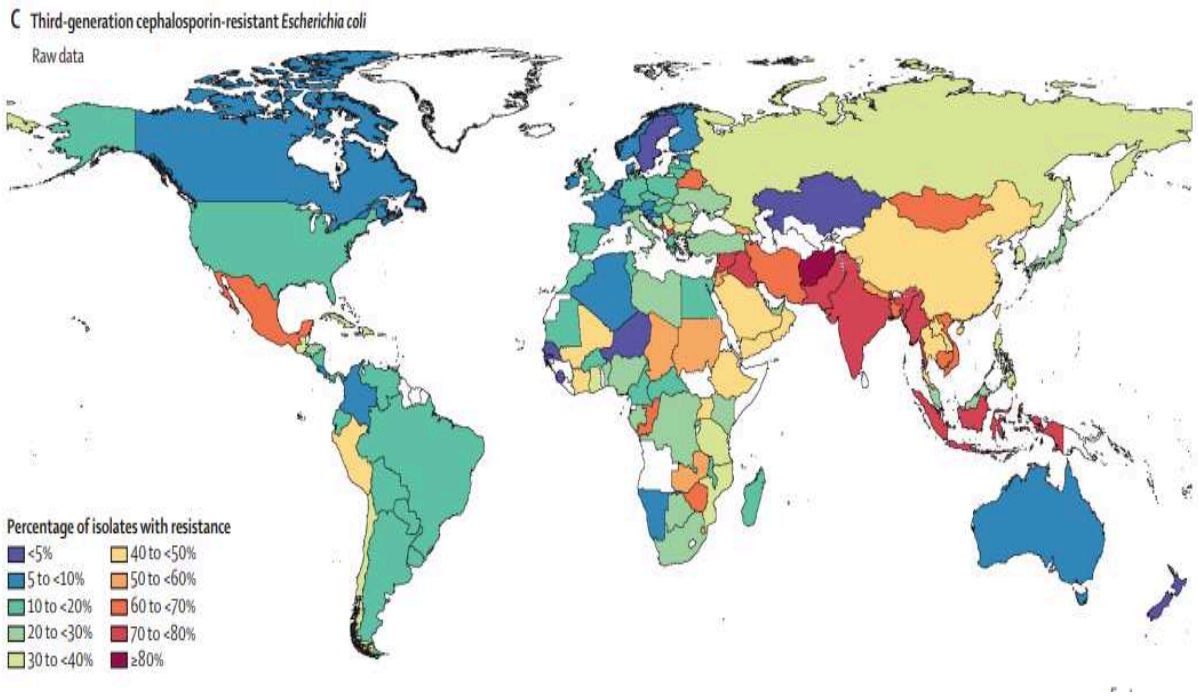


Figure 12. Prévalence mondiale d'*E. coli* résistants aux C3G en 2019 (Murray et al., 2022)**.**

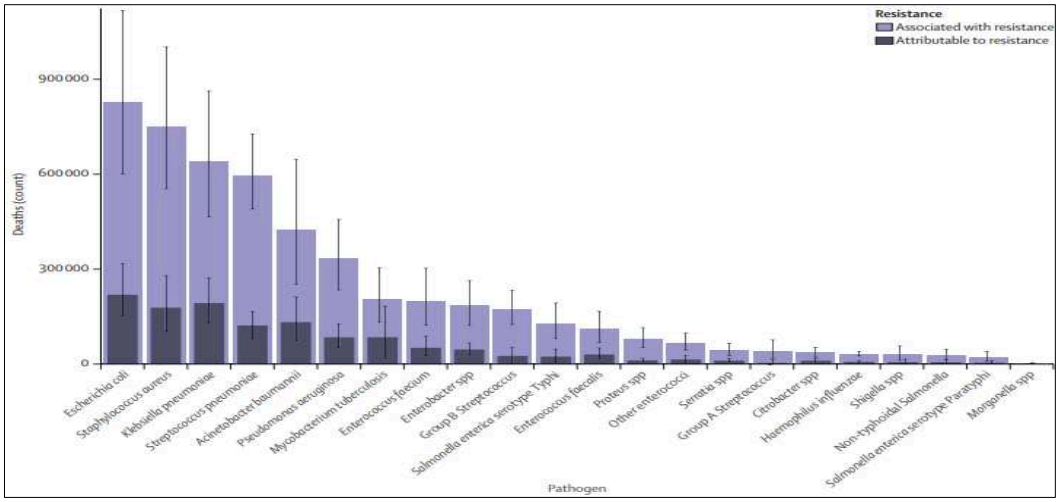


Figure 13. Nombre de décès dans le monde attribuables ou associés à la résistance bactérienne aux antibiotiques, par agent pathogène, 2019

(Murray et al., 2022)

En Europe, et dans le secteur humain, la commission européenne a lancé le système EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), devenu EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) en 2010. Ce réseau surveille les bactériémies causées par huit espèces bactériennes pathogènes pour l'Homme notamment *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, A. baumannii., S. pneumoniae, S. aureus, E. faecalis et E. faecium*, et implique actuellement 29 pays européens. L'ECDC (European Center of Diseases and Control) coordonne le Réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (EARS-Net), qui surveille la RAM dans les bactéries isolées à partir d'infections invasives dans le sang et le liquide céphalorachidien chez les patients hospitalisés (WHO and ECDC, 2023). En parallèle, le Réseau européen des maladies d'origine alimentaire et hydrique et des zoonoses (FWD-Net) : European Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses Network), surveille la RAM dans les cas d'infections humaines à *Salmonella* et à *Campylobacter* (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022b).

Selon le rapport de surveillance de la RAM en Europe qui a été élaboré par l'ECDC et l'OMS, et qui comprend les données compilées provenant de deux réseaux de surveillance de la résistance aux antimicrobiens couvrant l'Europe et l'Asie centrale. Ces réseaux sont le CAESAR (Central Asian and European Surveillance of

Antimicrobial Resistance) et le réseau EARS-Net. Au total, 16 pays ont rapporté des données à CAESAR, tandis que 27 pays de EU et les deux pays de l'EEA (Islande et Norvège) ont fourni des données à EARS-Net. Selon ce rapport, le nombre total d'isolats signalés était plus élevé en 2021 qu'en 2020, les espèces bactériennes les plus fréquemment signalées en 2021 étaient *E. coli* (39,4 %), suivi de *S. aureus* (22,1 %), *K. pneumoniae* (11,9 %), *E. faecalis* (8,8 %), *E. faecium* (6,2 %), *P. aeruginosa* (6,1 %), *Acinetobacter spp*. (3,0 %) et *S. pneumoniae* (2,5 %). La résistance aux C3G et aux carbapénèmes était généralement plus élevée chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli*. Bien que la résistance aux carbapénèmes soit restée rare chez *E. coli* dans la plupart des pays, 33 % des pays ont signalé des taux de résistance de 25 % ou plus chez *K. pneumoniae.* Cette résistance était également courante chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp., avec des pourcentages plus élevés que pour *K. pneumoniae*. *E. coli* est également la cause la plus fréquente d'infections du sang acquises en communauté et d'infections des voies urinaires. En 2021, la résistance aux fluoroquinolones était généralement plus élevée dans les parties du sud et de l'est de l'Europe. La résistance aux C3G chez *E. coli* variait d'un pays à l'autre, avec des pourcentages inférieurs à 10 % dans certains pays, tandis que d'autres présentaient des pourcentages égaux ou supérieurs à 50 % (Macédoine du Nord, Russie, Turquie et Ukraine) (WHO and ECDC, 2023).

Sur le plan international, l'OMS a lancé en 2015 un système de surveillance mondiale : Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS), visant à encourager la surveillance de la RAM dans les bactéries responsables d'infections courantes chez l'Homme, ainsi qu'à élaborer des stratégies pour lutter contre ce problème. En 2018, 71 pays (dont la Tunisie) étaient membres de GLASS, partageant ainsi des données sur l'utilisation et la résistance aux antimicrobiens. Maintenant, 127 pays, territoires et régions participent au programme GLASS. Le programme GLASS est structuré en plusieurs modules de surveillance régulière. Le module GLASS-AMR se concentre sur la surveillance clinique de la résistance aux antibiotiques, en ciblant des pathogènes tels que *A. baumannii*, *E. coli, K. pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Salmonella enterica, Shigella spp., S. aureus et S. pneumoniae.* Le module GLASSFUNGI surveille les infections invasives à *Candida spp*. La surveillance de la consommation d'antibiotiques au niveau national et mondial est prise en charge par le module GLASS-AMC. D'autres modules

permettent la réalisation d'enquêtes et d'études spécifiques, notamment le module EGASP pour la surveillance des infections à *N. gonorrhoeae*, le module One-Health qui surveille les *E. coli* produisant des BLSE chez l'Homme, dans la chaîne alimentaire et dans l'environnement, le module GLASS-EAR qui vise à détecter rapidement l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance, le module PPS-AMU pour les enquêtes ponctuelles sur l'utilisation des antibiotiques à l'échelle hospitalière, et enfin le module BURDEN qui évalue l'impact de la RAM sur la santé publique (WHO, 2022).

Selon le dernier rapport de GLASS, les bactériémies et les infections des voies urinaires ont été les plus fréquemment rapportées en 2021, parmi lesquelles *E. coli* était le pathogène le plus répandu. Des observations marquantes ressortent des données, notamment des augmentations significatives de plus de 15 % pour la résistance au méropenème (0,5 % [2017] - 0,9 % [2020]) et aux C3G (20,2 % [2017] - 24,0 % [2020]), ont été observées dans les bactériémies à *E. coli.* Les taux de résistance plus élevés au céfotaxime et au céftriaxone dans les bactériémies à *E. coli* par rapport à la céftazidime sont compatibles avec la distribution plus large des BLSE de type CTX-M dans le monde. De plus, des séries temporelles ont également révélé dans les bactériémies une résistance élevée (>50 %) aux carbapénèmes chez *Acinetobacter spp.* (médiane : 73,1 % [2017] - 72,9 % [2020]) et aux C3G chez *K. pneumoniae* (médiane : 61,5 % [2017] - 63,7 % [2020]) (WHO, 2022).

4.2.2. Surveillance de la RAM chez les animaux

La RAM chez les animaux d'élevage est une préoccupation croissante à l'échelle mondiale. Les animaux destinés à la production alimentaire traités par des antibiotiques peuvent devenir des réservoirs importants des bactéries résistantes et pourraient potentiellement transmettre ces bactéries à leurs manipulateurs humains et consommateurs humains. Selon l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), plusieurs espèces bactériennes revêtent une importance particulière en matière de RAM dans la production animale, et elles jouent un rôle équivalent dans la transmission d'infections humaines. Parmi ces espèces, on note *E. coli* résistant aux quinolones, aux sulfonamides et au triméthoprime (Ikhimiukor and Okeke, 2023).

Dans le secteur animal, l'Agence européenne des médicaments a créé l'ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) en 2009 pour surveiller la consommation d'agents antimicrobiens dans le secteur vétérinaire, couvrant 31 pays de l'Espace économique européen (EMA, 2018). L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) coordonne une surveillance active obligatoire de la RAM dans les bactéries zoonotiques (*Salmonella* et *Campylobacter*), les bactéries indicatrices (*E. coli* totaux) et les *E. coli* résistants aux céphalosporines à spectre élargi et producteurs de carbapénémases provenant d'animaux destinés à la production alimentaire (Lagrange et al., 2023). Dans le cadre de l'Action conjointe de l'UE sur la RAM et les infections associées aux soins de santé (EU-JAMRAI), une initiative a été lancée en 2017 pour mettre en place le réseau de surveillance européen de la résistance aux antimicrobiens en médecine vétérinaire (EARS-Vet). EARS-Vet vise à décrire la situation de la RAM, à suivre les tendances de la RAM et à détecter l'émergence de la RAM dans les bactéries provenant d'animaux malades en Europe (Mader et al., 2021).

En Europe, une étude conjointe de l'Agence européenne de sécurité alimentaire (EFSA) et du l'ECDC a analysé la RAM chez les animaux destinés à la production alimentaire dans plusieurs pays, y compris 27 pays de l'EU, les deux pays de l'EEA, la Suisse et le Royaume-Uni. Les données ont révélé que chez les *E. coli* indicateurs, des niveaux de résistance élevés ou très élevés à l'ampicilline, au sulfaméthoxazole, au triméthoprime ou à la tétracycline ont été observés presque dans toutes les espèces d'animaux d'élevage en 2020/2021 et dans la plupart des États membres. La résistance aux quinolones était courante dans la volaille, avec des niveaux très élevés ou extrêmement élevés signalés par plusieurs pays. D'importantes différences dans les niveaux de résistance ont été observées entre les pays, et en général, des niveaux plus bas ont été signalés en Europe du Nord. La résistance médiane globale aux C3G (céfotaxime et céftazidime) était rarement détectée avec un taux variant de 0,2% à 1,1%, à l'exception de quelques cas chez les veaux et les poulets d'engraissement. Ainsi, la résistance combinée aux C3G et aux fluoroquinolones était généralement peu fréquente dans toutes les catégories d'animaux. L'occurrence des BLSE et/ ou AmpC était généralement très faible ou faible, variant de 0,6% à 8,7% pour les isolats de porcs, de 0,7% à 3,5% pour les isolats de veaux, de 0,6% à 7,1% pour les isolats de poulets et de 0,6% à 6,3% pour

les isolats de dindes. Le phénotype BLSE était plus courant que l'AmpC dans l'ensemble des populations animales, et les isolats présentant un phénotype combiné (ESBL + AmpC) étaient peu fréquents. Ces résultats variaient de 64,2% (Allemagne) à 90,3% (Italie) chez les veaux, et de 6,5% (Finlande) à 80,7% (Italie) chez les porcs d'engraissement. De plus des souches d'*E. coli* productrices de carbapénèmases (portant les gènes *bla*$_{\text{OXA-48}}$, *bla*$_{\text{OXA-181}}$ et *bla*$_{\text{NDM-5}}$) ont été également signalées chez les porcs, les bovins et les viandes correspondantes par un nombre limité d'États membres en 2021 (Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2023). Cependant, des réseaux de surveillance de la RAM dans les animaux d'élevage dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (PRFI) sont absents. En effet, un rapport basé sur des données provenant de 191 études menées dans des pays d'Afrique, du Moyen-Orient, d'Asie, d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale, a montré que la Chine et l'Inde étaient les principaux foyers de la RAM avec de nouveaux foyers émergents au Brésil et au Kenya. De 2000 à 2018, la proportion d'antimicrobiens montrant une résistance supérieure à 50 % a augmenté, passant de 0,15 à 0,41 chez les poulets et de 0,13 à 0,34 chez les porcs, atteignant un plateau entre 0,12 et 0,23 chez les bovins. Parmi les antibiotiques considérés comme critiques pour la médecine humaine, les taux de résistance les plus élevés ont été observés pour la ciprofloxacine et l'érythromycine (20 à 60 %), tandis que les taux étaient modérés pour les C3G et C4G (10 à 40 %). Pour *E. coli*, la résistance aux quinolones dans les PRFI était élevée (20 à 60 %), de même que la résistance aux C3G (~40 %). La résistance aux carbapénèmes était faible chez toutes les espèces hôtes dans les PRFI. L'Asie et les Amériques présentent actuellement les taux les plus élevés de résistance à la colistine (18 à 40 %). En Afrique, les cartes de résistance révèlent l'absence de grands foyers de résistance aux antimicrobiens, à l'exception de la région métropolitaine de Johannesburg (Van Boeckel et al., 2019). Dans une autre revue basée sur les données de 176 études en Afrique, la prévalence des *E. coli* multirésistants variait de 20 % à 100 % au Nigeria, en Afrique du Sud, au Zimbabwe et en Tunisie, dans la plupart des cas dépassant les 80 %. Une prévalence plus élevée de la résistance a été signalée pour la tétracycline, les sulfamides et la pénicilline, qui sont les antibiotiques les moins chers et donc les plus largement utilisés (Kimera et al., 2020).

4.2.3. Surveillance de la RAM en Tunisie

Sur le plan national, LART (L'Antibio-Résistance en Tunisie), constitue le tout premier réseau de surveillance de la RAM en Tunisie. Son inauguration remonte à l'année 1999, et il a été mis en place grâce au soutien financier octroyé par le ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, ainsi que par le ministère de la Santé. Le principal objectif du LART est d'effectuer une surveillance continue de la RAM au sein des espèces bactériennes prédominantes dans les principaux centres Hospitalo-Universitaires tunisiens. Cette démarche vise à observer l'évolution des niveaux de résistance bactérienne et à identifier l'émergence de nouveaux schémas de résistance (STPI, n.d.) *Résistance bactérienne (infectiologie.org.tn)*. De plus, depuis 2018, la Tunisie a pris part au réseau mondiale de la surveillance de la RAM (GLASS) en signalant les niveaux de résistance aux antibiotiques au moyen de 11 laboratoires représentatifs à l'échelle nationale (WHO, 2022). Cependant, il est important de noter qu'actuellement, il n'existe pas de réseau de surveillance de la RAM dans le secteur animal en Tunisie.

5. Epidémiologie moléculaire de la résistance aux antibiotiques : trajectoires mondiales des BLSE/AmpC à travers les différents écosystèmes

Les enzymes de type BLSE et les céphalosporinases de type pAmpC ont une importance clinique majeure, et sont reconnues comme des priorités critiques par l'OMS (Tacconelli et al., 2018). Cette section a pour but de dresser le tableau de l'épidémiologie de ces enzymes dans la triade humains-animaux-environnement afin de comprendre leurs dynamiques complexes de diffusion. Un accent particulier sera mis sur la région Europe-Afrique du Nord, qui comprend l'axe migratoire des étourneaux et le lieu de vie des pigeons, afin de fournir un contexte complet permettant éventuellement de retracer l'origine des souches identifiées chez les oiseaux migrateurs et péri-domestiques en Tunisie.

5.1. Epidémiologie mondiale des BLSE/ AmpC en clinique humaine

Depuis les années 1990, les isolats de *K. pneumoniae* produisant des BLSE de types TEM et SHV ont été les principales causes d'épidémies nosocomiales à travers le monde. Différents variants d'enzymes, notamment TEM-10, TEM-12 et TEM-26 et TEM-52, ainsi que SHV-2, SHV-5, SHV-7 et SHV-12, ont été identifiées dans la plupart des environnements cliniques (De Angelis et al., 2020a). Au début des années 2000, des isolats produisant des CTX-Ms se sont répandus en Europe, en Amérique latine et dans la région Asie-Pacifique, marquant alors le début d'une pandémie des CTX-Ms. Cette dissémination a été observée non seulement dans l'environnement hospitalier, mais aussi dans la communauté (Cantón and Coque, 2006). *E. coli* est devenue l'espèce d'Enterobacterales la plus concernée par l'émergence de ces BLSE, dont la propagation a été déclenchée par l'utilisation massive de céphalosporines à large spectre en milieu hospitalier (Lahlaoui et al., 2014). Parmi les enzymes CTX-Ms, la CTX-M-15 est la β-lactamase la plus prédominante dans de nombreux pays d'Europe, d'Asie, d'Afrique et aux États-Unis (Figure14). Cette enzyme est fréquemment associée au clone pandémique d'*E. coli* B2 025:H4-ST131, un clone de haut risque majeur, jouant un rôle clé dans sa diffusion à l'échelle mondiale (Kocsis et al., 2022). L'enzyme CTX-M-14 est quant à elle majoritaire chez *E. coli* en Asie du Sud-Est, en particulier en Corée du Sud et au Japon, même si la CTX-M-15 est aussi présente dans ces pays, notamment en Chine. Les CTX-M-2 et CTX-M-8 sont de leur côté particulièrement prévalentes en Amérique du Sud (De Angelis et al., 2020) (Figure 14). Des études de surveillance récentes ont montré que CTX-M-27 est en train d'émerger dans certaines parties du monde, en particulier au Japon et en Europe (Peirano and Pitout, 2019b). Ces différentes CTX-M doivent leur succès épidémique d'une part au fait qu'elles sont trouvées portées par des clones pandémiques à haut risque dont la diffusion est mondiale, comme par exemple ST69, ST10, ST405, ST38, ST95, ST648, ST73 et ST1193 pour *E. coli*, ou ST11, ST15, ST147, ST307 pour *K. pneumoniae* (Kocsis et al., 2022), et d'autre part au fait qu'elles sont portées par des plasmides conjugatifs diffusant efficacement.

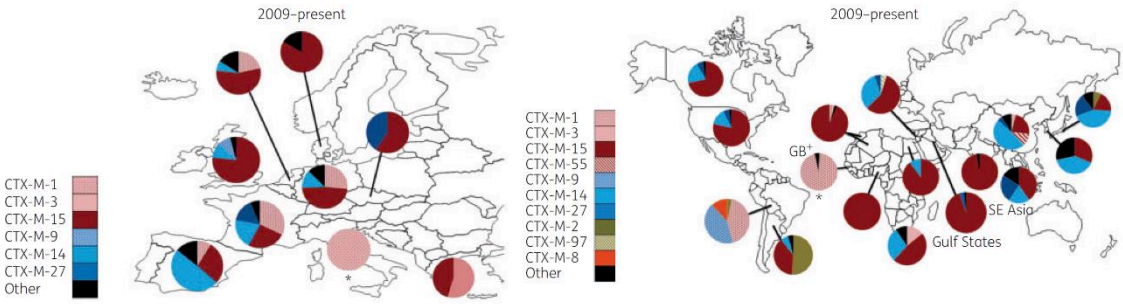


Figure 14. Epidémiologie mondiale des CTX-Ms durant la période 2009-2017 (données hospitalières et communautaires)

(Bevan et al., 2017)

Les gènes de type *ampC* peuvent également être transmis par des plasmides. La première souche portant une résistance plasmidique de haut niveau à la céfoxitine a été découverte en Corée du Sud, et l'enzyme nommée CMY-1 (Bauernfeind et al., 1998). Depuis lors, les CMY ont émergé à l'échelle mondiale, provoquant des épidémies hospitalières. Ces enzymes sont généralement associées aux Enterobacterales et à d'autres BGN. Selon une récente revue, la prévalence globale de la pAmpC est plus élevée dans la région comprenant l'Asie, l'Océanie, le Moyen-Orient et l'Amérique du Nord (Koga et al., 2019) que dans le reste du monde, avec des taux particulièrement élevés en Inde, au Népal et en Iran. En revanche, l'Europe présente la prévalence la plus faible, suivie de l'Amérique (Rodríguez-Guerrero et al., 2022). Parmi ces β-lactamases, CMY-2 constitue l'enzyme la plus répandue dans le monde (Jacoby, 2009). Cependant, DHA-1 a été identifiée comme l'enzyme la plus fréquemment isolée en Asie, et plus particulièrement en Chine. Elle prédomine également dans les isolats de *K. pneumoniae*, tandis que CMY-2 est plus fréquemment reportée dans les isolats d'*E. coli* (Rodríguez-Guerrero et al., 2022).

5.1.1. En Afrique du Nord

Comme dans le reste du monde, CTX-M-15 est la β-lactamase la plus prévalente en Afrique du Nord (Storberg, 2014). Sa première détection dans les pays arabes remonte à 2006 en Égypte, selon l'étude de Mohamed Al-Agamy *et al.* (Mohamed Al-Agamy et al., 2006). Depuis lors, cette enzyme a émergé dans d'autres pays de la

région, causant des épidémies hospitalières au Maroc (Barguigua et al., 2013; Perez-Palacios et al., 2023), en Algérie (Labid et al., 2023; Souna et al., 2022) et en Libye (Zorgani et al., 2017).

En Égypte, une fréquence élevée des gènes *bla*$_{CMY-2}$ et *bla*$_{CMY-4}$ a été observée dans des isolats cliniques d'Enterobacterales (Helmy and Wasfi, 2014; Khalaf et al., 2009). En Algérie, seuls quelques rapports ont été publiés concernant les souches d'Enterobacterales porteuses des gènes plasmidique de type *ampC* (*bla*$_{CMY-2}$ et *bla*$_{DHA-1}$) et ont été identifiées dans des établissements hospitaliers (Gharout-Sait et al., 2015; Nedjai et al., 2012). Des situations similaires ont également été observées en Libye (Abujnah et al., 2015; Zorgani et al., 2017b). Au Maroc également, des isolats d'*E. coli* responsables d'infections urinaires communautaires ont été identifiés comme porteurs du gène *bla*$_{CMY-2}$ (Barguigua et al., 2013).

5.1.2. En Tunisie

En Tunisie, la SHV-2 était la première BLSE détectée dans le pays en 1984, où elle a été isolée à partir d'un isolat clinique de *K. pneumoniae* (Philippon et al., 1989). Par la suite, plusieurs autres types de BLSE ont été rapportés dans différents hôpitaux tunisiens, avec comme dans le reste du monde une majorité de CTX-M-15. Le premier rapport documentant la présence de CTX-M-15 en Tunisie remonte à 2004, dans l'hôpital Charles Nicolle à Tunis (Chouchani et al., 2011). Depuis lors, cette enzyme s'est largement propagée, provoquant des épidémies tant en milieu hospitalier que dans la communauté. En 2006, la dissémination clonale d'une souche de *E. coli* multi-résistante porteuse du plasmide CTX-M-15 entre la Tunisie, la France et la République centrafricaine a été rapportée (Lavollay et al., 2006). Par ailleurs, dans cette étude, les plasmides transférés dans une bactérie receveuse conféraient un phénotype multirésistant (BMR) similaire à celui conféré par le plasmide pC15-1a, associé à une souche épidémique d'*E. coli* productrice de CTX-M-15 au Canada. D'autres BLSE, telles que CTX-M-9, -16, -28, -14, -27 et -55, ont également été signalées (Chouchani et al., 2011). Récemment, de nouvelles recherches ont mis en évidence l'émergence des clades ST131-C1-M-27 parmi les patients tunisiens infectés, tant dans la communauté que dans les établissements de santé. Cette apparition a également été constatée chez les manipulateurs d'aliments en Tunisie (Sallem et al., 2022), marquant ainsi l'émergence de cette enzyme dans le pays. En

2007, la CTX-M-14 a été identifiée pour la première fois dans un isolat clinique d'*E. coli* en Tunisie, marquant également sa première détection en Afrique du Nord (Ben Slama et al., 2011). Par la suite, cette β-lactamase a été signalée dans 4 isolats cliniques de *E. coli* reportés en 2010 dans l'hôpital militaire de Tunis (Lahlaoui and Moussa, 2011) et plus récemment dans 14/163 isolats de *E. coli* produisant des BLSE dans deux hôpitaux universitaires à Sfax (Mnif et al., 2013a). Dans ces études, les souches d'*E. coli* produisant la CTX-M-14 appartenaient aux clones pandémiques ST38 et ST131. Les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ et *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ ont été détectés, avec la présence de la séquence IS*Ecp1* en amont de ces gènes.

La première AmpC médiée par un plasmide découverte en Tunisie était de type CMY-4, et elle a été isolée à partir d'isolats cliniques de *P. mirabilis* multi-résistants (Chouchani et al., 2011). Depuis lors, elle est devenue la plus répandue dans les isolats cliniques, responsable de plusieurs épidémies hospitalières (Ben Tanfous et al., 2018; Chérif et al., 2015; Mnif et al., 2013b). Le gène *bla*$_{\text{CMY-4}}$ est également souvent précédé de la séquence IS*Ecp1*, et porté par des plasmides conjugatifs de types IncA/C, IncFIA, IncFIB, IncQ ou IncFIIK (Chérif et al., 2015).

5.1.3. En Europe

L'enzyme qui domine l'épidémiologie des BLSE chez l'Homme est la CTX-M-15, qui est observée dans tous les pays européens. Des foyers clonaux d'Enterobacterales productrices de CTX-M-15 ont été signalés dans plusieurs pays européens, notamment en France, Italie, Espagne, Portugal, Autriche, Norvège et au Royaume-Uni. Au sein du groupe CTX-M-1, les variants CTX-M-1 et CTX-M-32 étaient initialement prédominants dans la région méditerranéenne, mais ils se sont désormais répandus dans presque tous les pays européens (Cantón et al., 2008). Le variant CTX-M-55, qui constitue le deuxième enzyme de BLSE le plus fréquemment détecté en Asie (Zeng et al., 2021), a commencé à émerger dans des isolats cliniques dans certains pays européens (Birgy et al., 2018). Les enzymes principalement responsables de la production de BLSE dans les pays d'Europe de l'Est sont les CTX-M-3, SHV-2 et SHV-5 (Ghafourian et al., 2015). La prévalence des BLSE varie également d'un pays à l'autre, avec des enzymes spécifiques pour chaque région. Par exemple, l'enzyme CTX-M-1 a émergé en Italie et est la plus détectée dans les isolats cliniques (Di Marcantonio et al., 2022). En France, les

BLSE les plus prévalentes détectées sont CTX-M-15, CTX-M-1, CTX-M-14 et SHV-12, d'après une étude multicentrique incluant 18 hôpitaux (Robin et al., 2017). En Espagne et au Portugal, les enzymes les plus fréquemment isolées sont CTX-M-9, SHV-12, CTX-M-14 ainsi que CTX-M-10. En Pologne, l'épidémiologie des BLSE est dominée par CTX-M-3 (Livermore et al., 2007). En ce qui concerne le Royaume-Uni, l'enzyme CTX-M-15 est la plus fréquente, tandis que la CTX-M-3 ou CTX-M-9 sont plus rarement détectées (Ibrahim et al., 2023). L'enzyme CTX-M-15 est également responsable d'épidémies hospitalières en Belgique et en Allemagne (Rodriguez-Villalobos et al., 2011).

En Europe, la prévalence des enzymes AmpC est globalement moins élevée que dans d'autres régions du monde. Cependant, parmi les AmpC présentes, CMY-2 est l'enzyme la plus répandue, suivie de près par DHA-1. Des études ont rapporté la présence de CMY-2 dans différents pays européens. Cette enzyme a été signalée au Danemark (Jørgensen et al., 2010), en France (Courpon-Claudinon et al., 2011), aux Pays-Bas (Voets et al., 2012), au Portugal (Ribeiro et al., 2019) avec une fréquence moins faible qu'en Allemagne (Rohde et al., 2020), en Espagne (Pascual et al., 2016) et en Angleterre (Findlay et al., 2020).

5.2. Epidémiologie mondiale des BLSE/AmpC dans l'environnement hydrique

Des Enterobacterales produisant des BLSE ont été détectées en dehors du cadre clinique, dans les eaux usées, les eaux environnementales, les animaux sauvages, le bétail, les animaux de compagnie et les produits alimentaires. Les milieux aquatiques ont particulièrement attiré l'attention des scientifiques en tant que points chauds pour l'émergence, l'accumulation et la dissémination de gènes de résistance cliniquement importants, y compris les BLSE. En effet, l'environnement se révèle être une niche importante de bactéries non pathogènes portant naturellement dans leur chromosome des gènes qui peuvent, une fois mobilisés par un plasmide et transférés à une bactérie pathogène, être d'importance critique. Ainsi, l'origine environnementale de gènes de résistance tels que les BLSE et les carbapénèmases, qui ont maintenant diffusé chez l'Homme et dans d'autres écosystèmes, a été

démontrée (Poirel et al., 2012b; Sekizuka et al., 2011). Mais ces gènes peuvent aussi se propager et retourner à ces bactéries environnementales, comme le démontre une étude menée par notre équipe de recherche qui a montré que les gènes *bla*$_{OXA-204}$ et *bla*$_{NDM-1}$, très répandus en milieu hospitalier et dans les effluents tunisiens, pourraient se propager et retourner à la bactérie *Shewanella spp* (Ncir et al., 2022) (Article en annexe). Ceci souligne le rôle que peut jouer l'environnement dans la dissémination des gènes de résistance.

Des études ont été menées dans le monde entier pour évaluer la prévalence des Enterobacterales produisant des BLSE dans les eaux de surface, afin de comprendre l'étendue de la contamination et le rôle de l'environnement hydrique en tant que voie de transmission de ces bactéries, dont certaines sont compilées dans la récente publication de Cho *et al.* (Cho et al., 2023a). Les sources identifiées dans cette revue sont en premier lieu anthropogénique. Il n'est donc pas étonnant de trouver une cohérence assez significative entre les enzymes détectées chez l'Homme et celle détectées dans son environnement hydrique proche.

5.2.1. En Afrique du Nord et en Tunisie

En Afrique du Nord, plusieurs études ont été réalisées pour détecter la présence des BLSE dans l'environnement hydrique. Ces recherches ont principalement été menées en Tunisie et en Algérie. En Tunisie, les résultats ont montré que le gène *bla*$_{CTX-M-15}$ était le plus prévalent parmi les gènes de résistance détectés dans les eaux usées et les rivières. Il était suivi par les gènes *bla*$_{CTX-M-1}$, *bla*$_{CTX-M-27}$, *bla*$_{CTX-M-55}$ et *bla*$_{CTX-M-14}$ (Ben Said et al., 2016; Hassen et al., 2021; Sghaier et al., 2019). Si le clone *E. coli* ST131 a été rapporté, en raison de son lien avec la clinique humaine, les clones porteurs de BLSE ne sont en général pas identifiés. En Algérie, des études ont rapporté la présence des gènes *bla*$_{CTX-M-15}$ et *bla*$_{CTX-M-3}$ dans des isolats d'Enterobacterales en-dehors des hôpitaux, notamment dans les effluents hospitaliers, dans les stations d'épuration des eaux usées urbaines et dans l'eau de mer des plages (Alouache et al., 2014, 2012; Anssour et al., 2014; Tafoukt et al., 2017). En ce qui concerne les β-lactamases de type AmpC, la CMY-2 a été signalée en Tunisie dans des isolats d'*E. coli* provenant des eaux usées et des effluents hospitaliers (Ben Said et al., 2016). De même, la CMY-4 a également été détectée dans les effluents hospitaliers en Algérie (Anssour et al., 2014).

5.2.2. En Europe

Dans les eaux de surface en Europe, l'enzyme CTX-M-15 était la BLSE la plus répandue surtout chez les Enterobacterales, détectée dans plusieurs pays, notamment en Allemagne, en Autriche, aux Pays-Bas, en Suède, en France, en Norvège et en Suisse (Cho et al., 2023b). En Italie, la CTX-M-1 était la plus prévalente (Caltagirone et al., 2017), tandis que la CTX-M-14 était la plus répandue en Espagne (Pérez-Etayo et al., 2020). D'autres variants de BLSE, dont CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-24, CTX-M-28, CTX-M-32, CTX-M-55 et CTX-M-79, ont été moins fréquemment détectés dans les eaux de surface en Europe. En plus de ces variants de BLSE, d'autres enzymes telles que TEM-3, TEM-52 et SHV-2 ont été également identifiées, avec une prévalence notable des Enterobacterales productrices des BLSE de type SHV-12. Parmi les isolats détectés dans les eaux de surface, les souches d'*E. coli* appartenant au clone ST131 ont été fréquemment identifiées à travers tout le continent européen (Cho et al., 2023). La présence d'AmpC a été signalée dans l'environnement hydrique de huit pays européens, à savoir la Croatie, l'Estonie, l'Allemagne, la Grèce, la Pologne, l'Espagne, la Suède et la Suisse (Coertze and Bezuidenhout, 2019).

5.3. Epidémiologie mondiale des BLSE/AmpC dans le bétail et les animaux domestiques

La première description d'une BLSE chez les bovins a été rapportée au Japon, dans un isolat de *E. coli* produisant une CTX-M-2 (Shiraki et al., 2004). Depuis lors, les cas d'Enterobacterales produisant des BLSE ont été décrits dans toutes les filières animales, avec une majorité d'études provenant d'Europe et d'Asie. Les BLSE ont été isolées autant en contexte de portage (échantillons fécaux pour la plupart) que clinique (mammites, processus diarrhéiques, infections…) (Palmeira and Ferreira, 2020). Les données actuelles indiquent que le variant CTX-M-1 prédomine parmi les animaux de rente à l'échelle mondiale (Tseng et al., 2023). Parallèlement, le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ s'est avéré être le plus répandu parmi les BLSE isolées chez les animaux domestiques et est fréquemment détecté chez les isolats d'*E. coli* provenant de chiens et de chats à travers le monde (Salgado-Caxito et al., 2021). Maintenant, le

gène *bla*$_{CTX-M-55}$ a commencé aussi à disséminer chez différentes espèces des animaux d'élevage et domestiques à travers les continents (Cormier et al., 2019; Hounmanou et al., 2021; Lupo et al., 2018).

5.3.1. En Afrique du Nord

En Afrique du Nord, l'émergence de *E. coli* produisant les enzymes CTX-M-15 et CMY-2 en Égypte a été initialement signalée à partir d'échantillons de sang provenant de cœurs de poulets septicémiques en 2011 (Ahmed et al., 2013). Toujours en Égypte, une prévalence élevée des BLSE de type CTX-M-15 et CTX-M-9 a été observée chez les bovins (Braun et al., 2016), alors que des CTX-M-15 surtout, et dans une moindre mesure des CTX-M-14, ont été détectés chez des Enterobacterales isolées de carcasses de poulet (Abdallah et al., 2015). Chez les animaux domestiques, des β-lactamases de type CTX-M ont été détectées dans des isolats d'Enterobacterales provenant de prélèvements rectaux de chats et chiens en Égypte (Abdel-Moein and Samir, 2014). En Algérie, des isolats de *E. coli* produisant des CTX-M-1, CTX-M-15 et SHV-12 ont été identifiés à partir d'intestins de poulets abattus, tandis que des souches d'*E. coli* productrices de CTX-M-1 et CTX-M-15 ont été identifiées dans des échantillons d'origine aviaire provenant des régions centrales du pays (Belmahdi et al., 2016; Meguenni et al., 2014).

5.3.2. En Tunisie

Les premières BLSE chez les animaux d'élevage en Tunisie ont été détectées dans des isolats de *E. coli* provenant d'aliments d'origine avicole en 2006. Ces isolats présentaient des souches portant des β-lactamases de type SHV-5, CTX-M-8, CTX-M-14 et CTX-M-1 (Jouini et al., 2007). La situation dans ce pays reflète celle observée à l'échelle mondiale, où les gènes *bla*$_{CTX-M-1}$ et *bla*$_{CMY-2}$ sont les plus fréquemment détectés dans les isolats d'*E. coli* provenant d'échantillons de poulet (Grami et al., 2016, 2013; Maamar et al., 2016). En outre, les gènes *bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{CTX-M-55}$ (Hassen et al., 2020) et *bla*$_{CTX-M-9}$ ont été isolés de *E. coli* provenant d'échantillons fécaux de poulets malades ou morts (Grami et al., 2014). Ces gènes de type *bla*$_{CTX-M}$ ont été localisés sur divers plasmides, dont les types les plus fréquemment rencontrés étaient IncI1, suivis par IncF et IncFIB. Il est à noter que les gènes *bla*$_{CTX-M}$ et *bla*$_{CMY}$ en Tunisie présentent également des

associations avec la séquence d'insertion IS*Ecp1*. De plus, en ce qui concerne les souches de *E. coli* dans ce pays, la production d'AmpC est également conférée par des mutations dans la région promotrice du gène *ampC* chromosomique (Dandachi et al., 2018). Ces tendances se retrouvent également chez d'autres animaux d'élevage tels que les bovins et les moutons, où les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ et *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ sont fréquemment détectés (Grami et al., 2014; Jouini et al., 2022; Saidani et al., 2018; Slama et al., 2010). La première détection des β-lactamases CTX-M-1 et AmpC chez les animaux de compagnie en bonne santé (chiens et chats) en Tunisie remonte à 2010, ce qui marque également la première détection de ces gènes en Afrique (Sallem et al., 2013). Ces gènes ont été également rapportés dans d'autres études (Grami et al., 2013), où l'on a constaté que le gène *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ était principalement porté par le plasmide IncI1, tandis que *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ était porté par des plasmides de type IncF (Grami et al., 2013). Par ailleurs, la séquence d'insertion IS*Ecp1* semble jouer un rôle dans la propagation des gènes *bla*$_{\text{AmpC}}$, en plus des gènes *bla*$_{\text{CTX-M}}$.

5.3.3. En Europe

- **Chez les bovins**

Tous les pays européens ont signalé des cas d'Enterobacterales produisant des BLSE chez les bovins, dans les diarrhées de veaux et plus rarement dans les mammites. La CTX-M-1 est l'enzyme la plus fréquemment identifiée, suivie de CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-3 et SHV-12 (Dantas Palmeira and Ferreira, 2020). La France, qui est le plus grand producteur de bovins en Europe, a signalé la présence d'une prévalence élevée des BLSE chez les bovins. Ces cas de BLSE sont liés aux β-lactamases : CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32, CTX-M-55, CTX-M-57, SHV-12, TEM-52, TEM-71 et TEM-126. Parmi elles, CTX-M-15 est prédominante et a été détectée dans des échantillons d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* d'origine fécale et clinique (Dandachi et al., 2018). Le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ était présent sur des plasmides IncI1, mais aussi sur des plasmides IncF/F31:A4:B1 et IncF/F2:A–:B–, qui sont largement rapportés chez les humains (Madec et al., 2012). En Espagne, les gènes de résistance *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ et *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ étaient les plus fréquemment isolés chez le bétail. Ces gènes étaient principalement portés par les

plasmides IncI1 et IncX1 (Tello et al., 2022, 2020). En Italie, c'est la β-lactamase CTX-M-1 qui a été la plus fréquemment détectée chez les animaux d'élevage (Stefani et al., 2014). La Suisse a présenté des BLSE chez les bovins avec CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-117, TEM-186. Ils ont été signalés chez 3 espèces : *E. coli*, *Citrobacter youngae* et *E. cloacae*. La Turquie est le deuxième plus grand producteur de bétail d'Europe et a présenté un nombre important de BLSE chez les bovins avec CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15, SHV-5, SHV-12 et OXA-10 dans *E. coli*, *C. freundii* et *Citrobacter brakii* d'origine fécale. Les pays nordiques présentent peu de rapports et une grande diversité de β-lactamases, avec des BLSE chez les bovins hébergeant CTX-M-1 au Danemark et en Finlande et CTX-M-1 et CTX-M-15 en Suède, toutes dans *E. coli* et d'origine intestinale. La CTX-M-1 a été décrite en Hongrie, en République tchèque et en Slovaquie, et CTX-M-14 en Belgique chez les bovins. Tous les cas concernent *E. coli* et sont d'origine fécale et clinique (Palmeira et al., 2021a).

Contrairement à la diversité observée dans les BLSE de type CTX-M détectées chez les animaux d'élevage, et en ce qui concerne les AmpC β-lactamases, la CMY-2 a été identifiée comme l'enzyme la plus largement répandue à travers différentes régions et hôtes étudiés (Ewers et al., 2012; Madec et al., 2017).

- **Chez les volailles**

L'élevage des volailles est l'une des industries alimentaires les plus répandues dans le monde, et le poulet est l'espèce la plus communément élevée, avec plus de 90 milliards de tonnes de viande de poulet produites par an (Nhung et al., 2017). Des *E. coli* multi-résistants et d'autres Enterobacterales porteuses de BLSE/AmpC sont fréquemment trouvés dans le tractus intestinal des volailles et dans les environnements des bâtiments d'élevage (par exemple, rats, mouches, animaux sauvages, fumier/litière) (Koutsoumanis et al., 2021). Chez la volaille et les produits à base de volaille, la CTX-M-1, TEM-52 et SHV-12 étant les types de BLSE les plus signalées en Europe (Saliu et al., 2017). La CTX-M-1 est l'enzyme la plus signalée dans tous les pays européens, tandis que les "anciens" types de BLSE TEM-52 et SHV-12 dominaient aux Pays-Bas et au Portugal, avec une faible prévalence en Suède et au Danemark (Olsen et al., 2014). Au Danemark, des *E. coli* producteurs céphalosporinases à large spectre ont été détectés dans 93 % des élevages de

poulets de chair en 2011. Ces isolats présentaient les gènes *bla*$_{CMY-2}$, *bla*$_{SHV-2}$ ou *bla*$_{CTX-M-1}$. Le gène *bla*$_{CMY-2}$ était surtout présent sur des plasmides IncI1 ou IncK (Agersø et al., 2014). Le gène *bla*$_{CTX-M-1}$ a été très répandue en Suisse 71% (Geser et al., 2012), au Pays-Bas 54%, et au Royaume-Uni 57% (Wu et al., 2013). En Italie, dans une grande étude englobant 200 élevages industriels de volaille dans le pays, les gènes conférant un phénotype BLSE/AmpC (*bla*$_{CTX-M-1}$, *bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{CTX-M-2}$, *bla*$_{SHV-12}$ et *bla*$_{CMY-2}$) ont été détectés dans 7 %, 9 % et 4 % des isolats de dindes, de poulets de chair et de poules pondeuses, respectivement. Une prévalence marquée de plasmides IncI1/pST3 porteurs de *bla*$_{CTX-M-1}$ a été également reportée (Niero et al., 2018). En Espagne, les enzymes CTX-M-1 ont été les plus détectées dans des isolats de *E. coli* issus de poules pondeuses dans des élevages commerciaux suivi de SHV-12 et CTX-M-14 et CMY-2 était la seule AmpC enzyme détectée. Les plasmides IncI1 ont été la principale plate-forme pour ces gènes conférant un phénotype BLSE/AmpC (Aldea et al., 2022).

Cependant, une étude a révélé la plus forte prévalence mondiale (53 %) de *bla*$_{CTX-M-15}$ signalée dans les isolats d'*E. coli* de volaille en Roumanie (Maciuca et al., 2015). Cette enzyme était très moins fréquemment reportée en Belgique (2%) à partir de cinq différents élevages de poulet de chair (Smet et al., 2008) ainsi qu'en Allemagne et aux Pays-Bas (0.34-1,2%) (Saliu et al., 2017). Quant au gène *bla*$_{CTX-M-27}$, il a été isolé dans (0,34%) des isolats résistants de *E. coli* à partir de fèces des poulets dans des fermes en Allemagne (Blaak et al., 2015). Le gène *bla*$_{CTX-M-14}$ a été également détecté avec des fréquences très faibles en Allemagne, en Pays-Bas et en Belgique (Saliu et al., 2017). Chez les volailles, les gènes de BLSE se trouvent sur divers types de plasmides dont les plasmides IncI1 et IncFIB étant les types le plus fréquemment détectés. Ces plasmides sont souvent multirésistants dans la mesure où ils portent des gènes conférant des résistances additionnelles à d'autres antibiotiques ou métaux lourds (Saliu et al., 2017).

- **Chez les animaux de compagnie**

En ce qui concerne les animaux de compagnie, plusieurs types de BLSE ont été détectés, notamment CTX-M-1, CTX-M-32, CTX-M-15, CTX-M-14 et TEM-52, dans divers pays européens. Parmi eux, CTX-M-1 et CTX-M-15 ont montré une prévalence plus marquée. De plus, la CMY-2 portée par un plasmide IncI1/pST2 a

été largement identifiée (Bogaerts et al., 2015; Haenni et al., 2014; van den Bunt et al., 2020). L'émergence et la propagation des bactéries productrices des BLSE/AmpC chez les animaux de compagnie représentent un risque réel en raison de leur proximité avec les humains. En effet le transfert clonal d'Enterobacterales productrices des BLSE entre les animaux de compagnie et les humains vivant dans le même foyer a été mis en évidence dans certains pays européens (Grönthal et al., 2018; Toombs-Ruane et al., 2020; van den Bunt et al., 2020).

5.4. Epidémiologie moléculaire de la résistance aux antibiotiques dans la faune sauvage

La faune sauvage occupe une place spécifique dans le règne animal. Ces animaux ne sont pas domestiqués, et ne sont pas soumis directement à des traitements antibiotiques. Néanmoins, leur proximité avec les humains, le bétail, les animaux domestiques ou les environnements anthropisés peut accroître leur exposition à des substances sélectives, à des bactéries commensales provenant d'humains et d'autres espèces, ainsi qu'à des gènes de résistance bactérienne (Torres et al., 2020). Par conséquent, ils peuvent également être porteurs de bactéries présentant des gènes de résistance à des antibiotiques d'intérêt clinique majeur, qu'ils sont donc à même de disséminer (Laborda et al., 2022b). La prévalence de la résistance dans la faune sauvage est plus élevée dans les zones où l'activité humaine est plus importante, ce qui suggère que la résistance aux antibiotiques chez les animaux sauvages est un indicateur de la pollution d'origine humaine. De plus, la faune sauvage pourrait jouer un rôle dans l'évolution et la dissémination de la RAM. Certains animaux peuvent servir de réservoirs et de vecteurs pour la dissémination locale de cette résistance. Au sein de la faune sauvage, les animaux migrateurs pourraient contribuer davantage que d'autres animaux à la propagation de la résistance aux antibiotiques sur de longues distances géographiques (Laborda et al., 2022b).

Les données recueillies jusqu'à présent mettent en évidence que la faune sauvage constitue un réservoir diversifié et significatif de différents variants de BLSE, tels que les gènes codants pour les CTX-Ms à savoir *bla*$_{\text{CTX-M-32}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-}}$

$_2$, *bla*$_{CTX-M-22}$, *bla*$_{CTX-M-27}$, *bla*$_{CTX-M-55}$, *bla*$_{CTX-M-8}$, *bla*$_{CTX-M-24}$, *bla*$_{CTX-M-25}$, *bla*$_{CTX-M-28}$, *bla*$_{CTX-M-29}$ et *bla*$_{CTX-M-124}$. Plus de 180 espèces animales sauvages ont été signalées comme porteuses des gènes de résistance avec une prédominance des oiseaux (Palmeira et al., 2021b). Cependant, quatre classes de céphalosporinases ont été principalement isolées, incluant trois types de BLSE (CTX-M-1, CTX-M-14 et CTX-M-15) ainsi qu'une variante d'AmpC (CMY-2). Parmi ces enzymes, CTX-M-15 a été la plus fréquemment observée, avec CTX-M-1 en deuxième position, principalement détectée dans les pays européens et moins signalée en Asie. En Afrique, CTX-M-1 n'a pas encore été identifiée chez les animaux sauvages (la présente étude constitue sa première description). La distribution de CTX-M-14, troisième variant le plus répandue, ne présentait pas de prévalence significativement élevée en Europe, mais était fréquemment constatée en Asie, où il a été initialement documenté (Torres et al., 2020). Plus de 170 séquences type (ST) différentes ont été identifiées dans des isolats de *E. coli* producteurs de BLSE d'origine sauvage. Parmi eux, le clone pandémique ST131 était le plus fréquemment détecté. De plus, d'autres STs ont été décrites chez les animaux sauvages, tels que ST10, ST69, ST405, ST410 et ST648, et sont responsables de la distribution intercontinentale de CTX-M. Les clones ont été identifiées principalement chez les oiseaux de mer tels que les mouettes (*Larus fuscus*, *Larus michahellis*, *Larus cachinnans*, et *Larus delawarensis*) (Poirel et al., 2012a; Simões et al., 2010) et chez des mammifères tels que les sangliers sauvages et les macaques (Bachiri et al., 2017). En ce qui concerne les supports génétiques abritant ces gènes, le gène *bla*$_{CTX-M-15}$ est principalement associé aux plasmides de type IncF, souvent avec plusieurs réplicons contenant IncFIA et IncFIB, ainsi qu'aux plasmides de type IncI1. Même s'il est rare, le plasmide IncI2 a également été identifié comme porteur du gène *bla*$_{CTX-M-15}$. Il est intéressant de noter que le gène *bla*$_{CTX-M-1}$ a principalement été localisé sur des plasmides de type IncI1 dans la faune sauvage en Europe, plasmide aussi décrit pour porter d'autres gène conférant un phénotype BLSE comme *bla*$_{CTX-M-3}$, *bla*$_{SHV-12}$ *et bla*$_{TEM-52}$ (Wang et al., 2017a). Cependant, les plasmides de type IncN, IncF et IncHI1 ont également été signalés comme porteurs du gène *bla*$_{CTX-M-1}$.

5.4.1. En Afrique

L'Afrique est un continent riche en faune sauvage exerçant une influence significative sur les populations humaines, en tant que source de ressources essentielles pour l'alimentation, le tourisme et la culture. Cependant, il est important de noter que les recherches menées sur la RAM sont encore limitées. Une revue systématique des données couvrant la période de 2004 à 2021 a révélé que seuls 9 pays d'Afrique du Nord et d'Afrique centrale ont entrepris des études sur la RAM au sein de la faune sauvage. Une prédominance majeure de CTX-M-15 a été signalée dans toutes ces études (Figure 15). Cette BLSE a été identifiée dans 18 espèces animales provenant de sept pays différents. Des isolats de *E. coli* à haut risque, telles que ST38, ST131, ST405 et ST648 ont été identifiées. Cette résistance a été signalée chez la faune sauvage dans 7 pays distincts, notamment en Algérie, au Sénégal, au Gabon, en République centrafricaine, au Soudan, en Égypte et en Tunisie, dont les espèces les plus étudiées étaient les oiseaux et les mammifères (Palmeira et al., 2021b).

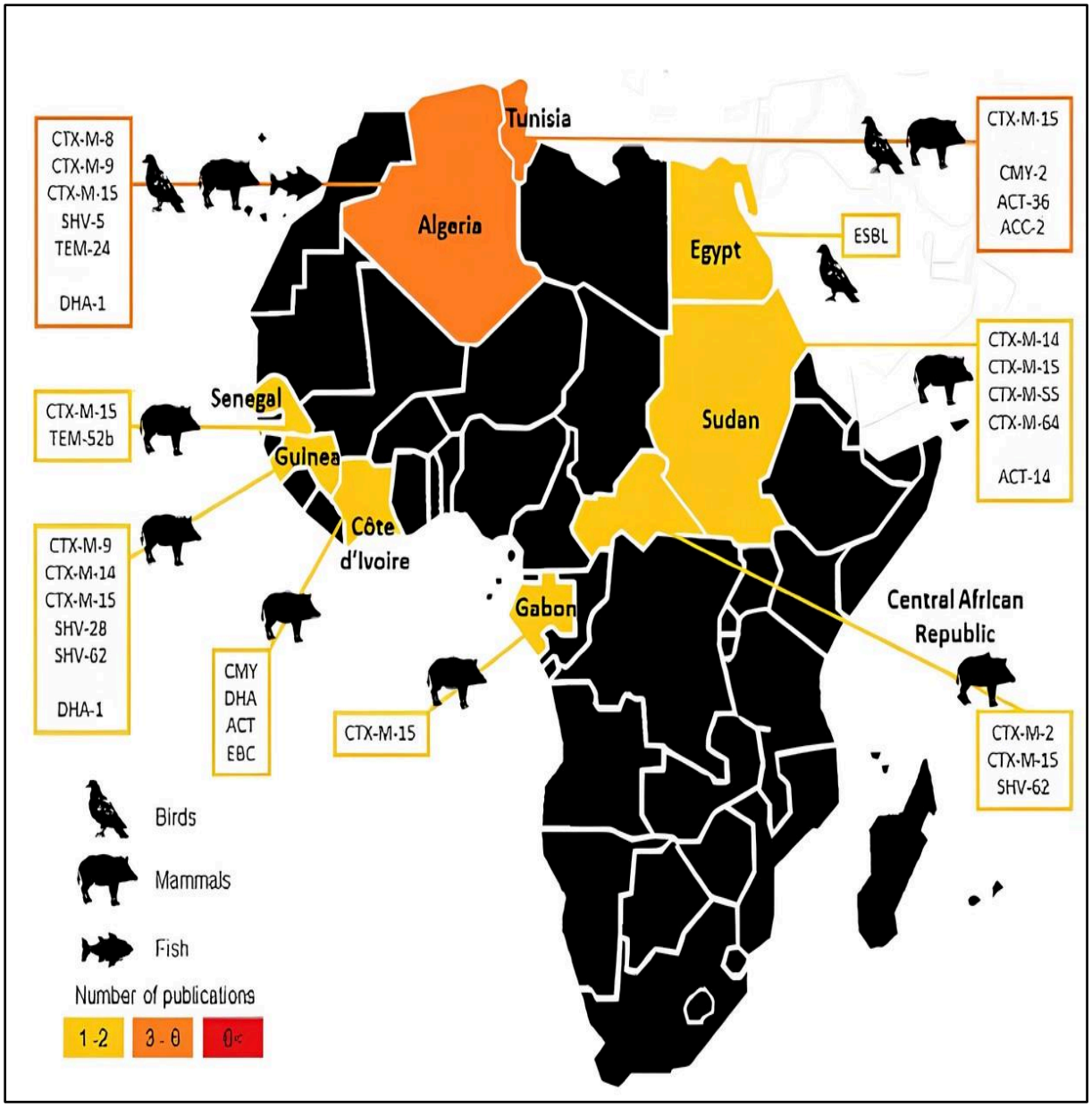


Figure 15. Epidémiologie des BLSE et AmpC céphalosporinases chez la faune sauvage en Afrique.

(Palmeira et al., 2021b)

5.4.2. En Europe

La recherche sur la RAM chez la faune sauvage en Europe est largement concentrée en Espagne, au Portugal, en Allemagne, en Pologne et en Suède (Palmeira et al., 2021b). La chasse en Europe, qu'elle soit pratiquée pour des raisons culturelles ou pour la gestion de la faune, offre indirectement une excellente opportunité d'évaluer le risque de propagation de maladies infectieuses des ongulés sauvages à la santé publique. Selon une revue systématique couvrant les données de la littérature sur la période 2004-2020, les animaux hôtes porteurs de céphalosporinases en Europe sont des oiseaux, des mammifères, des reptiles, des poissons et des mollusques, totalisant ensemble 106 espèces différentes en tant que réservoirs de ces enzymes. Il existe une grande variété de céphalosporinases signalées, sans profil nettement prédominant. Cependant, CTX-M-15 est mentionnée chez 42 espèces hôtes réparties dans 18 pays, suivie de CTX-M-1 présente chez 42 espèces animales dans 17 pays, CMY-2 décrite chez 33 hôtes provenant de 11 pays, SHV-12 chez 31 hôtes de 10 pays et CTX-M-14 rapportée chez 20 hôtes issus de 8 pays (Palmeira et al., 2021b) (Figure16).

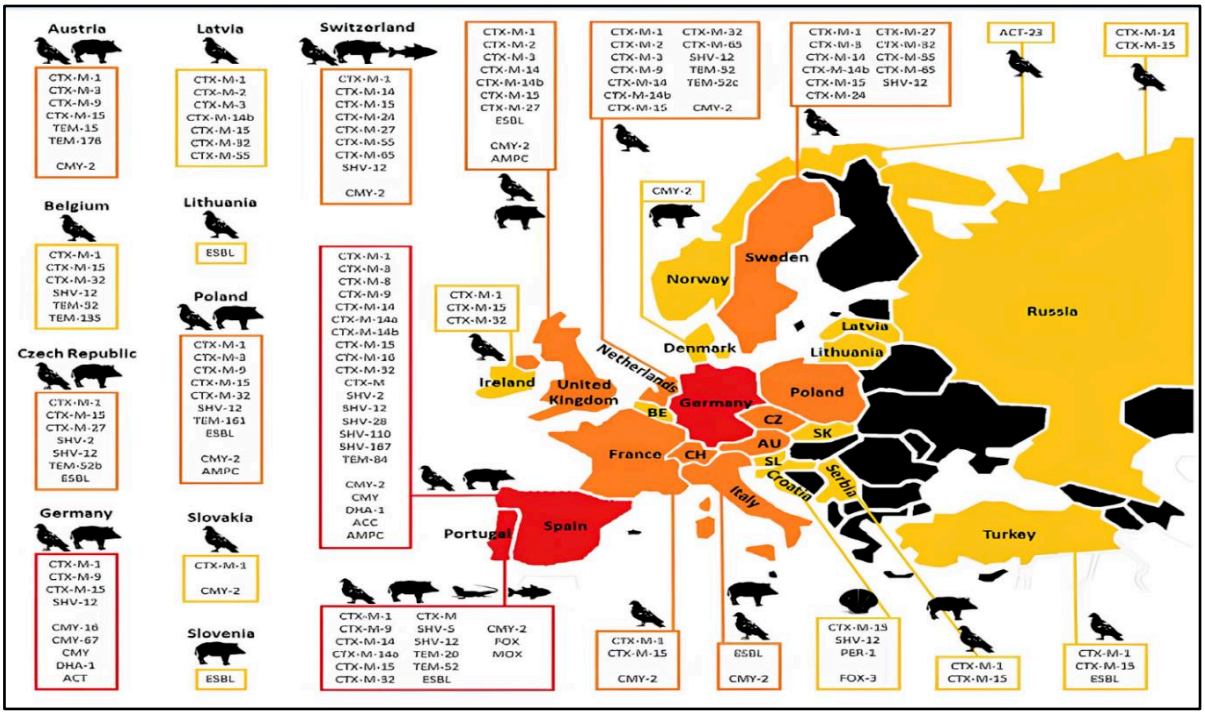


Figure 16. Epidémiologie des BLSE et AmpC céphalosporinases chez la faune sauvage en Europe

(Palmeira et al., 2021b)

6. Ailes porteuses : le rôle des oiseaux sauvages dans la dissémination mondiale de la résistance aux antibiotiques

Parmi les animaux sauvages, les oiseaux constituent l'espèce animale la plus largement étudiée en ce qui concerne les questions liées à l'antibiorésistance. Ils suscitent un grand intérêt en raison de leur rôle crucial dans la dissémination globale de la RAM, et ce de plusieurs manières distinctes. Premièrement**,** ils servent de réservoirs et de foyers de bactéries résistantes aux antibiotiques ainsi que de gènes de résistance. Deuxièmement, leur capacité à migrer sur de longues distances en peu de temps en fait des vecteurs potentiels de propagation de la résistance aux antibiotiques. Troisièmement, ils agissent potentiellement comme des indicateurs, reflétant les activités humaines et leur impact sur l'environnement en raison de leur large éventail de niches écologiques et de leur exposition fréquente aux bactéries d'origine humaine et environnementale.

6.1. Les oiseaux sauvages : un réservoir important de bactéries résistantes et de gènes de résistance

6.1.1. Réservoir de gènes de résistance aux céphalosporines de dernière génération

Les premières bactéries résistantes aux antibiotiques détectées dans la faune sauvage l'ont été chez les oiseaux sauvages. En effet, des souches de *E. coli* résistantes à plusieurs antibiotiques, tels que le chloramphénicol, ont été isolées chez les pigeons en 1975 (Sato et al., 1978). Les premiers cas d'*E. coli* producteurs de BLSE de type CTX-M-14 ont été détectés chez des oiseaux sauvages en 2006 au Portugal (Costa et al., 2006). Au cours des dernières années, de nombreux rapports ont suivi, principalement en Europe (Palmeira et al., 2021a). A ce jour, des souches d'*E. coli* productrices de BLSE ont été isolées chez des oiseaux sauvages sur tous les continents du monde, à l'exception de l'Antarctique. Bien que ce dernier soit connu comme le dernier continent vierge, isolé du reste du monde par les circulations océaniques et atmosphériques, une récente étude vient de signaler la présence de *Salmonella enterica* multi-résistantes isolées à partir des manchots

Pygoscelis (*Pygoscelis spp.)*. Les chercheurs n'ont pas déterminé l'origine de la résistance, mais ils ont émis l'hypothèse que les manchots pourraient avoir transporté le bactérie résistante depuis un autre endroit suite à leur migration (Hwengwere et al., 2022; Retamal et al., 2017).

Les bactéries porteuses de BLSE ont été principalement détectées chez des espèces d'oiseaux sauvages, notamment les goélands, les rapaces, les pigeons, les canards, les cigognes blanches, les milan noirs, les corbeaux et les oiseaux de proie (Palmeira et al., 2021b). Des Enterobacterales productrices des BLSE ont été décrites chez les oiseaux sauvages, principalement *E. coli* et *K. pneumoniae*. En Europe, une diversité des β-lactamases de type CTX-M a été rapportée. L'espèce d'oiseau la plus fréquemment étudiée est le goéland migrateur. Des BLSE de type CTX-M-15, CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-27, CTX-M-32, CTX-M-55, SHV-12 et récemment CTX-M-9 (Haenni et al., 2020) ont été détectées, avec une prédominance particulière de CTX-M-1 et CTX-M-15 (Zeballos-Gross et al., 2021a). Les CTX-M-15 et CTX-M-1 étaient aussi les enzymes les plus couramment détectées chez les mouettes de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) dans le nord du Chili, qui migrent à travers l'Amérique, du Canada au Chili et parfois jusqu'en Europe occidentale (Báez et al., 2015). De plus, des β-lactamases de type AmpC, notamment CMY-2, ACT-14, ACT-15 et ACT-23 ont été signalées chez plusieurs espèces de goélands sur le continent européen avec une prévalence élevée de CMY-2 (Zeballos-Gross et al., 2021b). Cette enzyme a été détectée aussi en Amérique du nord (Ahlstrom et al., 2018), Amérique du sud (Liakopoulos et al., 2016b) et Océanie (Dolejska et al., 2016).

En Afrique, très peu d'études ont été menées sur la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques chez les oiseaux sauvages. En Tunisie, par exemple, seulement 3 études ont été réalisées sur les oiseaux sauvages. L'une de ces études a porté sur 111 échantillons de fèces provenant de différentes espèces d'oiseaux sauvages, et a rapporté la présence d'isolats d'*E. coli* produisant la β-lactamase CTX-M-15 chez des espèces telles que le serin d'Europe, les oiseaux verts, les chardonnerets et les goélands argentés. La plupart des oiseaux porteurs ont été capturés à Bizerte. Les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ ont été identifiés sur différents réplicons plasmidiques, notamment IncF (FII, FIA, FIB), IncW, IncHI2, IncA/C, IncP, IncI1 et IncX, avec une prédominance des types IncF et IncW. De plus, les séquences

IS*Ecp1* et orf477 ont été trouvées respectivement en amont et en aval de tous les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$. Les isolats appartenaient à trois séquences types, à savoir ST297/A, ST410/A et ST349/B2. D'autres BLSE de type CTX-M-15 et des AmpC, comme *bla*$_{\text{ACT-36}}$ et *bla*$_{\text{ACC-2}}$, ont été également décrites chez ces oiseaux. Les réplicons plasmidiques IncF, IncFIB, IncK, IncP, et IncX ont été identifiés comme porteurs de ces gènes de résistance (Ben Yahia et al., 2020). En Algérie, plusieurs études se sont penchées sur les oiseaux sauvages et ont révélé la présence notamment de CTX-M-15 chez les cigognes blanches migratrices (Bouaziz et al., 2018). De plus, CTX-M-14 a été récemment détectée chez les moineaux, marquant sa première occurrence en Afrique chez les oiseaux sauvages (Belmahdi et al., 2022). En Egypte des études ont décrit des résistances élevées aux céphalosporines chez des espèces d'Enterobacterales isolées à partir des oiseaux sauvages, mais ces résistances n'ont pas encore fait l'objet de caractérisation moléculaire approfondie (Nabil et al., 2020; Suárez-Pérez et al., 2021, 2021).

6.1.2. Réservoir de gènes de résistance aux carbapénèmes

La première découverte de bactéries produisant des carbapénémases chez les animaux sauvages a été réalisée à partir d'oiseaux sauvages, plus précisément les milans noirs (*Milvus migrans*), en Allemagne. Ces oiseaux étaient porteurs d'un isolat de *Salmonella Corvallis* ST1541 présentant le gène *bla*$_{\text{NDM-1}}$. Ce gène était localisé sur un plasmide de type IncA/C, le plasmide pRH-1738 (Fischer et al., 2013a). Le séquençage complet de ce plasmide a confirmé l'hypothèse selon laquelle l'isolat de *Salmonella Corvallis* portant le gène *bla*$_{\text{NDM-1}}$ pourrait provenir de pays non européens. Il aurait été transféré en Allemagne par le biais de la migration des milans noirs. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que cette espèce bactérienne était déjà répandue en Asie du Sud-Est et émergeait également en Afrique du Nord et au Nigéria, plutôt que dans les pays européens (Fischer et al., 2013b). Plus récemment, en 2019, une étude menée en Chine a rapporté une fréquence élevée d'isolats (233 isolats de *Klebsiella spp*. et deux isolats d' *E. coli*) porteurs de la carbapénémase NDM-5 chez des oies (*Anser indicus*), des cormorans (*Phalacrocorax carbo*) et des goélands (*Larus ichthyaetus*) (Liao et al., 2019). Cette variante a été également signalée chez les cigognes en Algérie (Loucif et al., 2022d). Concernant, le gène IMP, la transmission à grande échelle de bactéries productrices de ce gène a été

signalée pour la première fois en 2015 chez des goélands en Australie, qui présentaient dans des isolats de *E. coli* les gènes bla_{IMP-4}, bla_{IMP-38} *ou* bla_{IMP-26}. Cette découverte reflète la situation épidémiologique de l'Australie, car ce gène était endémique dans le pays et fréquemment isolé dans les contextes cliniques (Dolejska et al., 2016).

Des MBL de type VIM telles que VIM-1 et VIM-4 ont été signalées dans les goélands Leucophées en France (Aberkane et al., 2015; Vittecoq et al., 2017) et en Espagne (VIM-1) (Vergara et al., 2017). De plus une VIM a été détectée chez un pigeon, dans un isolat de *E. coli* isolé au Brésil (Bueno et al., 2022a).

Des carbapénémases telles que OXA-48, OXA-181, OXA-208 ont été signalées en Europe, en Amérique du Nord (OXA-48) et en Océanie (OXA-48) dans plusieurs espèces de goélands (Zeballos-Gross et al., 2021b). En Afrique, l'OXA-48 a été également signalée au Maroc, dans un seul isolat de *E. coli* isolée chez un goéland leucophée (Barguigua et al., 2019), et plus récemment chez des pigeons urbains en Algérie (Loucif et al., 2022a, 2022b). Quant à KPC-2, cette carbapénémase a été observée en Alaska, en Espagne et en Turquie, tandis que KPC-3 a été détectée en Espagne au sein d'espèces de goélands (Ahlstrom et al., 2022). Elle a également été signalée dans d'autres pays européens (Zeballos-Gross et al., 2021a). En Afrique, ces variants ont été décrits par Ben Yahia *et al.* chez des isolats de *E. fergusonii* et *K. oxytoca* isolées d'oiseaux sauvages migrateurs en Tunisie (*Black-winged stilt, Cattle egret*) marquant la première détection de ces gènes chez des animaux sauvages en Afrique (Ben Yahia et al., 2018a).

6.1.3. Réservoir des gènes de résistance à la colistine

La colistine est classée par l'OMS comme un antibiotique critique et de dernier recours, utilisé pour traiter les infections graves causées par des BGN multirésistantes (BMR) et extrêmement résistantes (XDR) chez l'Homme et les animaux (Anyanwu et al., 2023). Le premier gène de résistance plasmidique est donc transmissible, nommé *mcr-1*, a été découvert en Chine chez des porcs domestiques en 2015 (Liu et al., 2016). Aujourd'hui, le gène *mcr-1* a été identifié sur tous les continents et plusieurs variants (*mcr-1* à *mcr-10*) ont été découverts, dont l'importance reste cependant mineure par rapport à *mcr-1*. Le rôle des oiseaux

sauvages en tant que réservoirs et vecteurs pour la répartition mondiale de *mcr-1* devrait être pris en compte. En effet, chez les oiseaux sauvages, le gène *mcr-1* a été reporté chez différentes espèces de goélands en Lituanie, Espagne, Portugal, Argentine et Amérique du nord (Ahlstrom et al., 2019b; Franklin et al., 2020; Liakopoulos et al., 2016a; Ruzauskas and Vaskeviciute, 2016). Le gène *mcr-1* a été également détecté chez des cigognes blanches et des pigeons en Algérie (Loucif et al., 2022d, 2022b). En Égypte, des investigations ont révélé la présence des gènes *mcr-1* et *mcr-2* chez diverses espèces d'oiseaux sauvages (Ahmed et al., 2019). La présence des gène de type *mcr* chez les oiseaux migrateurs soulève des inquiétudes, au même titre que la présence de gènes de type BLSE et carbapénémases (Nang et al., 2019).

6.2. Origine des bactéries et des gènes de résistance chez les oiseaux sauvages

L'émergence de la résistance aux antibiotiques se produit sous la pression de la sélection des antibiotiques, bien que d'autres éléments tels que les métaux lourds ou les biocides, puissent également favoriser la sélection de la RAM (Kunhikannan et al., 2021). La faune sauvage n'étant pas directement exposée aux antibiotiques, la présence dans le microbiote intestinal des animaux sauvages de gènes de résistance et de bactéries résistantes à des antibiotiques d'importance clinique devrait être considérée comme un indicateur de contamination de leur environnement plutôt que comme un signe de sélection de la RAM (Laborda et al., 2022b). En effet, il est souvent rapporté que la présence de bactéries résistantes aux antimicrobiens chez la faune sauvage découle du contact, pour boire ou se nourrir, avec des sources anthropogéniques telles que les exploitations agricoles et les déchets humains qui contaminent l'environnement avec des bactéries résistantes aux antibiotiques et/ou avec des antimicrobiens. Les exploitations agricoles, où le fumier et les lisiers peuvent être contaminés par des bactéries multi-résistantes, des antibiotiques (ou leurs métabolites) et d'autres facteurs sélectifs de la résistance aux antimicrobiens, constituent des habitats importants pour de nombreux petits oiseaux, tout comme les stations d'épuration où certains oiseaux et mammifères s'en nourrissent directement (Arnold et al., 2016). Le ruissellement des exploitations agricoles, des réservoirs de lisier et des champs fertilisés avec du fumier, ainsi que

les effluents des stations d'épuration, peuvent entraîner une contamination des cours d'eau locaux et des terres par les antibiotiques et les bactéries résistantes (Swift et al., 2019). Les changements environnementaux, y compris ceux liés à l'urbanisation, et l'agriculture, peuvent affecter la probabilité pour les oiseaux d'acquérir des agents pathogènes. Ces environnements nouveaux peuvent créer de nouvelles niches et trajectoires évolutives pour les oiseaux, ce qui peut avoir un impact sur l'écologie des agents pathogènes et de leurs vecteurs (Chung et al., 2018). En effet, des études ont mis en évidence que l'urbanisation et l'exposition aux humains peuvent influencer de manière significative la composition du microbiote intestinal des oiseaux (Gadau et al., 2019; Phillips et al., 2018).

Pour supporter ces hypothèses, des études transversales ont révélé que des oiseaux sauvages vivant dans des régions éloignées de la terre où la population humaine est rare, voire inexistante, comme l'Alaska (Ramey et al., 2018), l'Antarctique (Bonnedahl et al., 2008; Rahman et al., 2008) ainsi que les îles subantarctiques (Palmgren et al., 2000) ne portent peu ou pas de bactéries indicatrices résistantes aux antibiotiques. En revanche, les oiseaux sauvages échantillonnés dans les mêmes régions géographiques mais sur des sites davantage influencés par l'activité humaine hébergent plus fréquemment des bactéries résistantes aux antibiotiques (Atterby et al., 2016; Cerdà-Cuéllar et al., 2019; González-Acuña et al., 2013). De même, Marcelino *et al.* ont montré par une analyse comparative que des canards sauvages se nourrissant près d'une station d'épuration portaient une plus grande charge en gènes de résistance, y compris des gènes généralement associés aux plasmides multi-résistants, par rapport aux canards vivant sur d'autres sites (Marcelino et al., 2019). Une étude menée par Ahlstrom *et al.* a suivi grâce à des émetteurs satellites les mouvements des goélands qui se nourrissent dans les décharges de la péninsule de Kenai, en Alaska, et ils ont mis en évidence l'acquisition par ces oiseaux de *E. coli* résistantes d'origine humaine (Ahlstrom et al., 2019a). Finalement, les oiseaux marins ont été utilisés comme des indicateurs biologiques environnementaux pour détecter la présence de *E. coli* porteurs des gènes conférant un phénotype BLSE/pAmpC dans des zones éloignées. Cette utilisation découle de leur rôle de sentinelles permettant de surveiller les changements, qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique, affectant la santé des écosystèmes marins (Ewbank et al., 2022b; Hernández and González-Acuña, 2016).

Les preuves actuelles soutiennent largement l'idée que l'anthropisation de l'environnement contribue à l'augmentation de la prévalence de bactéries résistantes aux antibiotiques chez les oiseaux sauvages occupant ces habitats. Ainsi, ces oiseaux par leurs déplacements à travers les écosystèmes, leur statut de prédateurs en haut de la chaîne alimentaire et leurs contacts avec les populations humaines, sont des espèces idéales pour devenir des indicateurs du niveau de résistance présent dans l'environnement local et peuvent donc être utiles pour identifier les sources potentielles de contamination anthropogénique par la résistance aux antibiotiques (Ramey and Ahlstrom, 2019).

6.3. Dissémination des bactéries et des gènes de résistance par les oiseaux sauvages ?

Chaque année, des milliards d'oiseaux entreprennent des migrations intercontinentales, franchissant de grandes distances et migrant entre différents habitats, notamment des zones humides, des zones agricoles et des espaces urbains, traversant ainsi divers écosystèmes. Par exemple, environ 5 milliards d'oiseaux de plus de 300 espèces migrent de l'Amérique du Nord vers l'Amérique centrale et du Sud à chaque automne, et un nombre similaire voyagent de l'Europe de l'Est vers l'Afrique (Gill, 1995). Au cours de leurs voyages migratoires, ils entrent en contact avec divers réservoirs environnementaux de RAM, tels que le sol, les sources d'eau contaminées par des eaux de ruissellement agricoles ou des eaux usées. En tant que porteurs de bactéries résistantes et de gènes de résistance, les oiseaux migrateurs peuvent transporter, principalement par le biais de leurs excréments, des gènes de résistance et des bactéries résistantes cliniquement pertinents à travers différents écosystèmes, facilitant ainsi leur propagation vers de nouveaux endroits et de nouvelles populations (Figure 18). Ce potentiel de diffusion est amplifié par la capacité des oiseaux à couvrir de vastes zones géographiques, servant ainsi de vecteurs potentiels de la RAM au-delà des frontières et des continents. Certaines preuves indiquent que la migration augmente la prévalence des pathogènes entériques, en particulier chez les oiseaux migrateurs aquatiques, probablement en raison des grandes concentrations d'oiseaux provenant de vastes zones avec une forte production de fèces (Lu et al., 2013; Skov et al., 2008). De plus, il a été démontré que les comportements migratoires peuvent influencer la

prévalence de la résistance par des changements dans la physiologie de l'hôte, le stress et la fonction immunitaire, et peuvent contribuer à la dissémination des pathogènes sur de longues distances (Smith et al., 2020). Par la suite, ils peuvent ensuite disséminer ces bactéries ou ces gènes de résistance, par leurs interactions fréquentes avec d'autres espèces d'oiseaux, ainsi qu'avec d'autres animaux sauvages et domestiques (Dolejska, 2020).

Pour étayer cette idée, une étude a démontré que des souches multi-résistantes de *E. coli* et des gènes de résistance sont présents dans la flore intestinale des oiseaux sains de l'Arctique, l'une des régions les plus éloignées de la Terre, là où la pollution antibiotique est faible, voire inexistante et où la population humaine est rare (Sjölund et al., 2008). Une étude récente combinant des approches biologiques - phénotypiques et génotypiques - ainsi que la télémétrie par satellite pour suivre les mouvements des goélands, a montré que ces oiseaux peuvent acquérir des bactéries résistantes aux antibiotiques à partir de sources anthropogéniques (Ahlstrom et al., 2021). Par la suite, le suivi de ces oiseaux a permis de mettre en évidence la propagation intercontinentale des bactéries résistantes aux antibiotiques grâce à leurs mouvements migratoires. De plus, dans leur large étude, Ahlstrom *et al.* ont entrepris une analyse approfondie de la diversité génomique des Enterobacterales produisant des carbapénémases en se basant sur des échantillons de fèces prélevés chez les mouettes (*Larus* spp.) en Alaska, au Chili, en Espagne, en Turquie et en Ukraine, ainsi que chez les milans noirs (*Milvus migrans*) au Pakistan. Leurs résultats ont rapporté des preuves solides sur la dissémination spatiale de ces bactéries par le biais de ces oiseaux, reliant l'Alaska, l'Espagne et la Turquie (Figure 17). Ils ont par ailleurs mis en évidence des signes probants de leur dissémination dans le temps, observés entre les échantillons collectés en Alaska et au Pakistan (Ahlstrom et al., 2022). D'autres études ont démontré un transfert d'*E. coli* entre les humains et les oiseaux par la découverte d'une présence plus élevée d'*E. coli* chez les oiseaux sauvages en contact avec les humains par rapport aux oiseaux qui n'ont pas de contact humain (Gordon and Cowling, 2003). En France, la distribution dans la région côtière du sud de la France de *E. coli* productrices des BLSE d'origine humaine entre les goélands leucophées *(Larus michahellis*) et les humains (Bonnedahl et al., 2009) est une illustration évidente de ce transfert.

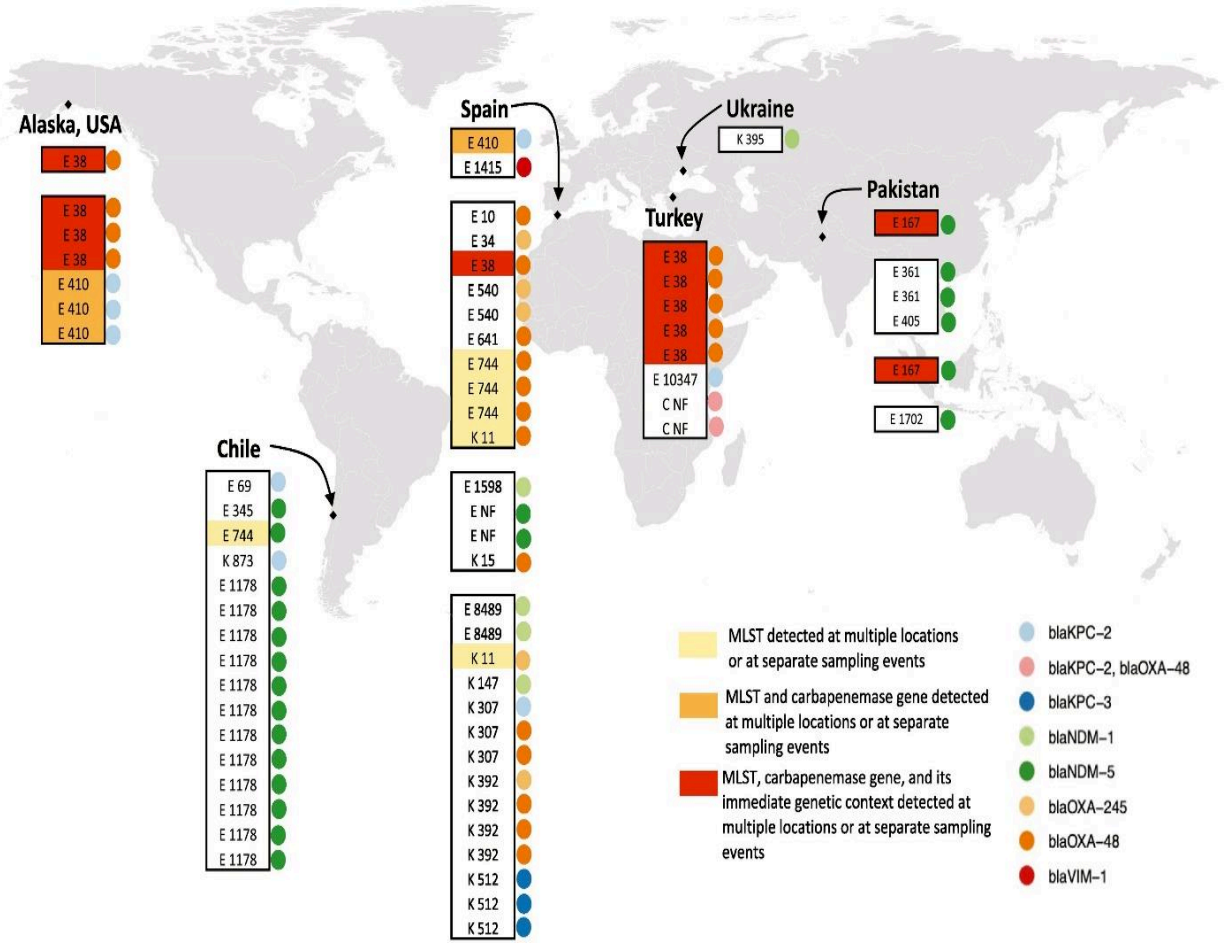


Figure 17. Répartition géographique et propagation potentielle des carbapénémases parmi les populations d'oiseaux sauvages dans différents pays dans l'étude de Ahlstrom *et al*. La couleur jaune représente les souches ayant la même ST, la couleur orange indique la présence du même gène de carbapénémase. La couleur rouge signifie que des souches avec le même contexte génétique immédiat du gène de carbapénémase ont été isolées à partir de lieux ou d'événements d'échantillonnage différents

Pour que les agents pathogènes entériques se propagent des oiseaux sauvages aux humains, les humains doivent entrer en contact direct ou indirect avec les agents pathogènes. Le contact direct avec les excréments des oiseaux peut être la principale source de propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques des oiseaux sauvages aux humains. Ce contact pourrait se produire lorsque les enfants jouent dans les terrains de jeux, les parcs ou les plages, touchent les excréments d'oiseaux et portent ensuite leurs mains à leurs bouches. De plus, la manipulation et la consommation d'oiseaux sauvages (comme les faisans ou les étourneaux) insuffisamment cuite représentent une autre source directe de transmission des

bactéries. Cependant, ces voies de transmission restent des hypothèses puisqu'il existe actuellement un vide important des connaissances en termes d'évaluation réelle des risques que ces oiseaux porteurs de souches résistantes peuvent représenter pour la santé humaine, il s'agit ainsi d'une question cruciale, qui devient de plus en plus pressante à mesure que la RAM continue de se propager. Cependant, il existe des sources de transmission indirectes de la RAM à l'Homme comprenant les produits agricoles contaminés, le bétail infecté, l'eau contaminée ainsi que les chats domestiques infectés suite à la consommation d'oiseaux (Smith et al., 2020). En effet, il a été démontré dans certaines études que des souches de *E. coli* multi-résistantes sont partagées entre les oiseaux sauvages et les animaux d'élevage (Benavides et al., 2022; Carlson et al., 2015; Chandler et al., 2020a). Le problème devient particulièrement préoccupant lorsque les oiseaux sauvages entrent en contact avec les champs de produits agricoles. Selon Rivadeneira *et al.*, il existe des preuves montrant que les oiseaux sauvages agissent comme des porteurs de *E. coli* pathogènes, les transférant entre les CAFO (installations d'alimentation animale concentrée) et les champs de produits agricoles. En effet, les oiseaux capturés dans un CAFO du sud de l'Arizona ont été équipés de radio transmetteur, les résultats de la radio télémétrie ont montré que les oiseaux se déplacent régulièrement entre le CAFO et les champs de produits frais et ces oiseaux ont été testés positifs pour *Salmonella* et *E. coli* pathogènes, ces isolats ont été également isolés dans les fèces des bovins provenant du CAFO pendant la même période (Rivadeneira et al., 2016). De plus, Le Jeune *et al.* ont montré que les oiseaux sauvages étaient impliqués dans la transmission de *E. coli* pathogènes entre les fermes laitières de l'Ohio en suivant leur déplacement (LeJeune et al., 2008). D'autre part, Chandler et al ont montré dans leur étude que des isolats d'*E. coli* multirésistantes phylogénétiquement conservés, ont été trouvés chez les étourneaux des parcs d'engraissement séparés par des distances dépassant 150 km, suggérant que les étourneaux pourraient être impliqués dans la dissémination interétatique de bactéries résistantes aux antibiotiques prioritaires dans la production animale destinée à l'alimentation (Chandler et al., 2020b). Également, d'autres études ont montré l'émergence des mêmes isolats des *Campylobacter* pathogènes entre les étourneaux et les bovins (Sanad et al., 2013) et entre les étourneaux et les poulets (Mohan et al., 2013). D'une façon générale, les oiseaux sauvages sont omniprésents, et leurs excréments peuvent se répandre librement dans l'environnement. Le transfert de la RAM des oiseaux migrateurs vers

d'autres écosystèmes peut avoir de profondes répercussions sur l'écologie et la santé publique, car il contribue à l'émergence et à la persistance de bactéries résistantes dans diverses niches environnementales. Cependant, il est actuellement difficile de mesurer les risques sanitaires liés aux bactéries résistantes aux antibiotiques présentes chez les animaux sauvages, car cela nécessite une surveillance active des bactéries résistantes d'importance clinique dans l'environnement. Celui-ci peut également jouer un rôle significatif dans la propagation globale de ces bactéries. Les oiseaux sauvages pourraient jouer un rôle crucial dans ce scénario, en particulier dans les pays où les normes d'hygiène et d'assainissement sont insuffisantes, avec un traitement des eaux usées et une gestion des déchets peu efficaces, et où les humains et les animaux vivent à proximité les uns des autres, favorisant ainsi la présence généralisée de bactéries multi-résistantes cliniquement importantes dans l'environnement y compris chez les animaux sauvages (Dolejska and Literak, 2019) (Figure 18).

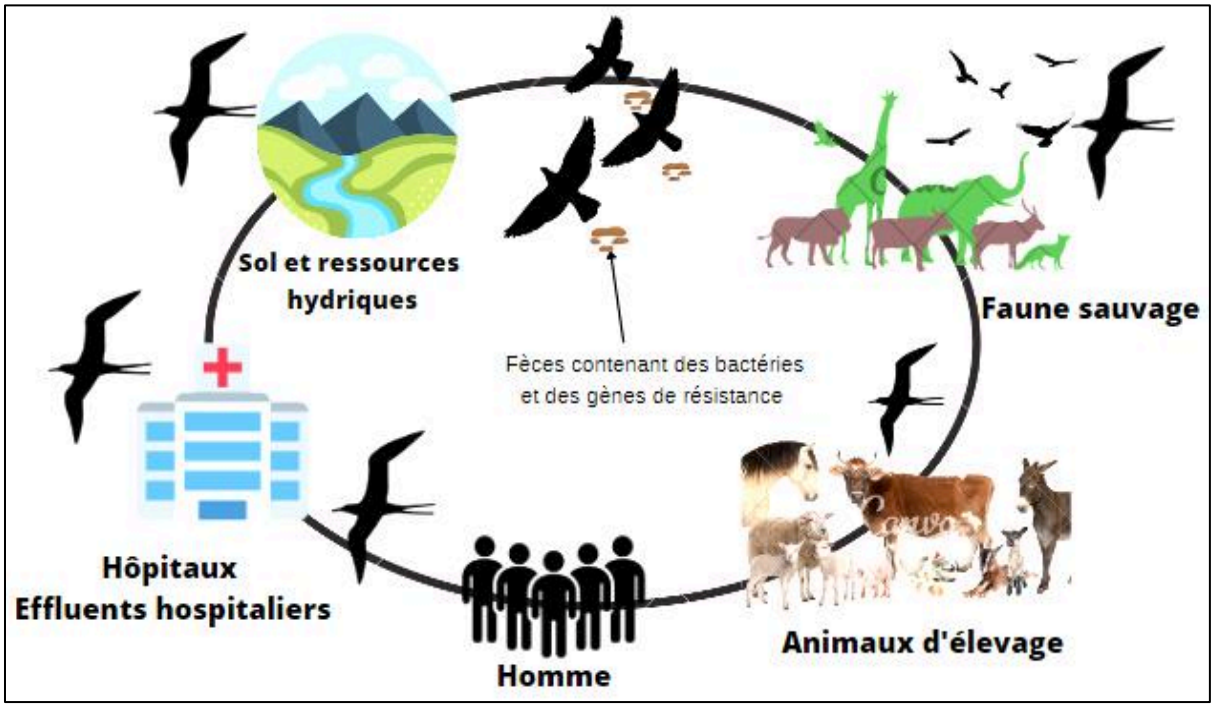


Figure 18. Schéma illustrant les voies de transmission des bactéries multi-résistantes entre les animaux d'élevage, la faune sauvage, l'environnement aquatique et les humains. Les oiseaux sauvages migrateurs sont présentés comme des vecteurs potentiels de dispersion, transportant des bactéries résistantes et des gènes de résistance via leurs fèces entre ces différents écosystèmes

(Créé par Canvas d'après Ben Yahia et al (Ben Yahia et al., 2018b))

7. Les espèces d'oiseaux investiguées dans cette étude

Le travail de thèse présenté ci-dessous se focalise sur deux espèces d'oiseaux, les étourneaux et les pigeons, dans le but de déterminer s'ils peuvent être porteurs de résistances aux céphalosporines de dernières générations ou aux carbapénèmes dans leur microbiote intestinal. Nous avons choisi les étourneaux comme sujet d'étude en raison de leurs routes migratoires qui relient l'Europe au Nord de l'Afrique, y compris la Tunisie. Pendant leur séjour en Tunisie, ces oiseaux sont chassés pour être consommés, ce qui pourrait accroître le risque de transmission de la RAM à l'Homme par le biais de la chaîne alimentaire. Par ailleurs, nous avons également choisi d'étudier les oiseaux péri-domestiques à travers la population de pigeons en raison de leur proximité avec l'Homme, ainsi qu'avec d'autres animaux d'élevage, domestiques et sauvages, ce qui crée une interface complexe où la RAM peut se propager à travers divers écosystèmes. Caractériser les isolats résistants trouvés dans ces contextes distincts est essentiel d'une part pour déterminer si ces deux espèces d'oiseaux sont de réels points d'intérêts pour la dissémination de la RAM et d'autre part pour évaluer la dynamique de la RAM dans des environnements écologiques différents.

7.1. Les étourneaux sansonnets

L'étourneau sansonnet *(Sturnus vulgaris)* est une espèce d'oiseau sauvage commune et largement répandue originaire d'Europe et d'Asie. Ces oiseaux ont maintenant été introduits dans de nombreuses autres régions, notamment en Amérique du Nord, en Afrique du Sud, en Australie et en Nouvelle-Zélande (Linz, 2007). L'introduction des étourneaux sansonnets en Amérique du Nord a eu lieu en 1890 dans le cadre d'une initiative de l'American Acclimatization Society visant à peupler Central Park avec les oiseaux mentionnés dans les pièces de Shakespeare et, depuis, ils sont devenus l'une des espèces d'oiseaux les plus abondantes et répandues sur le continent (Bodt et al., 2020). Les étourneaux sansonnets sont si répandus qu'ils en deviennent problématiques et qu'ils ont été classés parmi les trois espèces d'oiseaux les plus envahissantes sur la liste de l'Union internationale pour la conservation de la nature (Boudjelas et al., 2000). La population mondiale des

étourneaux est estimée à environ 150 millions d'individus matures. La population en Europe, qui représente environ 55 % de l'étendue mondiale, est estimée entre 28,8 millions et 52,4 millions de couples d'individus matures (Bird life international, 2019).

7.1.1. Distribution géographique

L'aire de répartition des étourneaux sansonnets s'étend de l'Atlantique, y compris ses îles comme l'Irlande, les îles nord-britanniques, les Açores, Madère et les Canaries, jusqu'au cœur du continent eurasiatique autour du lac Baïkal, englobant les latitudes tempérées et s'étendant vers le nord jusqu'à la taïga. En Espagne, l'espèce occupe principalement l'extrême nord-ouest. Vers le sud-est, son aire de distribution s'étend sur l'Asie Mineure, puis vers l'Iran, le sud de l'Asie centrale, le nord du Pakistan et le nord-est du continent indien (François, 2023) (Figure 19).

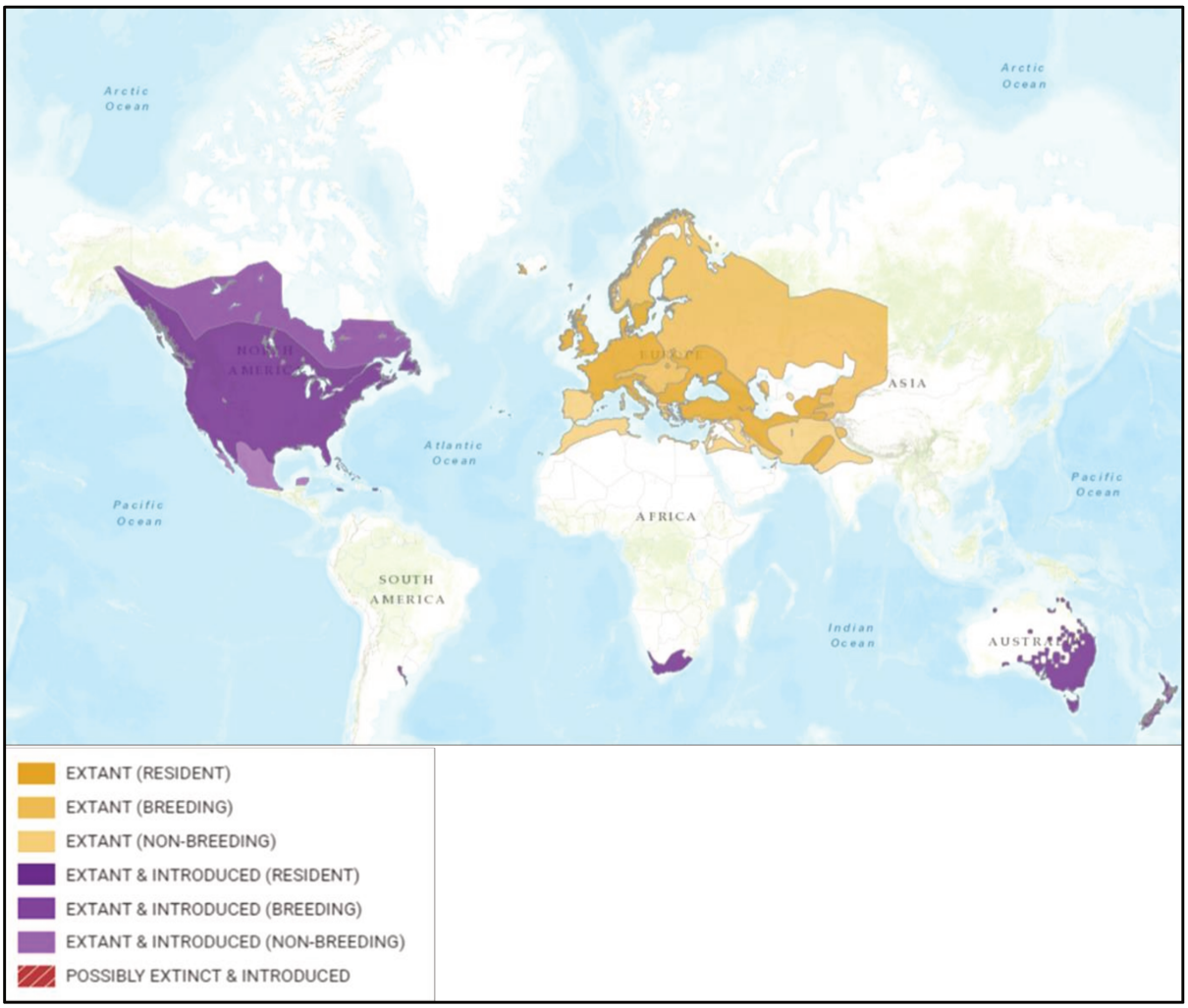


Figure 19. Carte de la distribution de l'espèce étourneau sansonnet dans le monde.

(IUCN, 2023)

7.1.2. Habitat et écologie

Les étourneaux sansonnets occupent divers habitats, y compris les zones découvertes et les habitats modifiés, pour se reproduire et se nourrir. Ils préfèrent les cavités près des zones ouvertes avec de l'herbe courte pour se nourrir. En-dehors de la saison de reproduction, ils exploitent une variété d'habitats tels que les landes, les marais salants, les bords de mer, les champs labourés, les vergers, les décharges et les stations d'épuration. Pour se reposer, on les trouve dans les roselières, les buissons, les arbres, les ponts, les bâtiments et même au centre des villes. Pendant la saison de reproduction, de mars à juillet, ils construisent un nid volumineux dans des trous d'arbres, des falaises ou des structures artificielles, avec une couvée généralement de quatre à six œufs (Bird life international, 2019).

7.1.3. Régime alimentaire

Les étourneaux sansonnets sont omnivores, se nourrissant des aliments d'origine animale et végétale toute l'année, mais avec une prédominance des aliments d'origine animale au printemps. Leur alimentation se concentre principalement sur les insectes et autres invertébrés lorsqu'ils sont disponibles. Ils se nourrissent fréquemment de sauterelles, de coléoptères, de mouches, de chenilles, d'escargots, de vers de terre, de mille-pattes et d'araignées. De l'été à l'hiver, les étourneaux sansonnets accordent une grande importance aux fruits dans leur régime alimentaire. Ils consomment des cerises sauvages et cultivées, des baies de houx, des cendres, des mûres, du Tupélo, du lierre grimpant, du sumac et des mûres sauvages (Cornell University, 2023). Dans les régions méditerranéennes, comme au Maghreb par exemple, en hiver, des millions d'individus d'étourneaux se rassemblent dans les oliveraies, provoquant des dégâts considérables. Par ailleurs, les étourneaux sansonnets trouvent une autre source de nourriture dans les décharges et centres d'enfouissement techniques, où ils ont accès toute l'année à des déchets alimentaires d'origine humaine. De plus, on les trouve régulièrement dans les exploitations agricoles où ils se nourrissent de fumiers et d'ensilages. Les étourneaux sansonnets ont une alimentation très adaptable, ce qui leur permet de prospérer dans différents habitats et environnements (François, 2023).

7.1.4. Migration

Les étourneaux sansonnets sont des puissants migrateurs capables, si nécessaire, de migrer sur des distances de 1 000 à 1 500 km, notamment pour échapper aux fortes chutes de neige qui recouvrent leurs sources de nourriture. Ils peuvent parcourir de longues distances en une seule journée, volant à des vitesses de 60 à 80 km/h et faisant des escales en chemin pour se nourrir. Les schémas de migration varient selon les années, les régions et les individus (Linz, 2007). Certaines populations d'étourneaux sansonnets effectuent une migration annuelle au printemps et en automne. En automne, les populations nord-européennes et est-européennes migrent depuis leurs zones de reproduction vers le Sud, le Sud-Ouest et l'Ouest, notamment vers l'Europe de l'Ouest et l'Afrique du Nord. D'autres populations sont sédentaires, comme celles du sud et de l'ouest de l'Europe, les populations originaires de la mer Noire et du Pakistan, ainsi que la majorité des populations nord-américaines. En Afrique du Sud, les étourneaux de la province du Cap sont sédentaires.

7.1.5. Antibiorésistance chez les étourneaux

Les étourneaux sansonnets, ont été reconnus comme réservoir important des bactéries pathogènes comme *E. coli* et *C. jejuni* ainsi que *Salmonella.* Des preuves solides ont mis en évidence la propagation et la dynamique de ces agents pathogènes bactériens par ces oiseaux (Cabe, 2021). Très peu d'études portant sur les étourneaux ont mis en évidence la présence de BLSE au sein de cette population aviaire. Par exemple, une enquête réalisée sur 1477 étourneaux européens provenant de 31 parcs d'engraissement répartis dans 5 États des États-Unis visait à détecter la résistance aux C3G chez *E. coli,* les auteurs ont identifié un taux de résistance de 4 %, avec 38 isolats portant le gène *bla*$_{\text{CMY-2}}$, neuf isolats portant le gène *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$, un isolat portant le gène *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ et deux isolats portant le gène *bla*$_{\text{CTX-M-32}}$ (Chandler et al., 2020b). Dans une autre étude réalisée en Espagne, Alcalá et al ont identifié une BLSE de type SHV-12 dans un seul oiseau d'étourneau unicolore *(Sturnus unicolor)* (Alcalá et al., 2016). De plus, une autre étude a révélé une prévalence élevée de résistance au céfotaxime dans des isolats de *E. coli* isolés à partir des étourneaux dans des fermes de bovins au Canada. Mais rien n'a été reporté sur la caractérisation moléculaire de ces souches (Medhanie et al., 2017).

7.2. Les pigeons

Les pigeons biset (*Columbia livia*) appartiennent à une grande famille Columbidés, qui regroupe plus de 49 genres et près de 350 espèces. Elle présente l'ancêtre du pigeon domestique. Cette espèce est originaire de l'Asie du Sud-Ouest, l'Afrique du Nord et l'Europe, puis elle était introduite dans de nombreux pays après domestication. Elle fait partie des espèces les plus répandues dans le monde. Elle se trouve dans tous les continents à l'exception de l'Antarctique (Shapiro and Domyan, 2013). La population mondiale est estimée à environ 260 000 000 d'individus. Rien qu'en Europe, la population est estimée à un nombre entre 11 millions et 22,6 millions de couples d'individus matures (Birdlife international, 2019).

7.2.1. Distribution géographique

Les populations de cette espèce occupent quasiment tout le territoire européen, y compris la péninsule ibérique et les côtes de la Méditerranée (Figure 20). Elles sont également présentes dans les îles où elles forment d'importantes colonies sur les falaises et les zones rocheuses. Dans les Alpes, elles se trouvent localement, mais c'est dans les îles britanniques que le pigeon biset est particulièrement abondant, avec une prédominance de populations pures en Écosse et en Irlande. Les populations naturelles de cette espèce sont sédentaires, résidant généralement dans la même région (IOC World Bird List (v13.1), Gill, F and D Donsker (Eds), 2023).

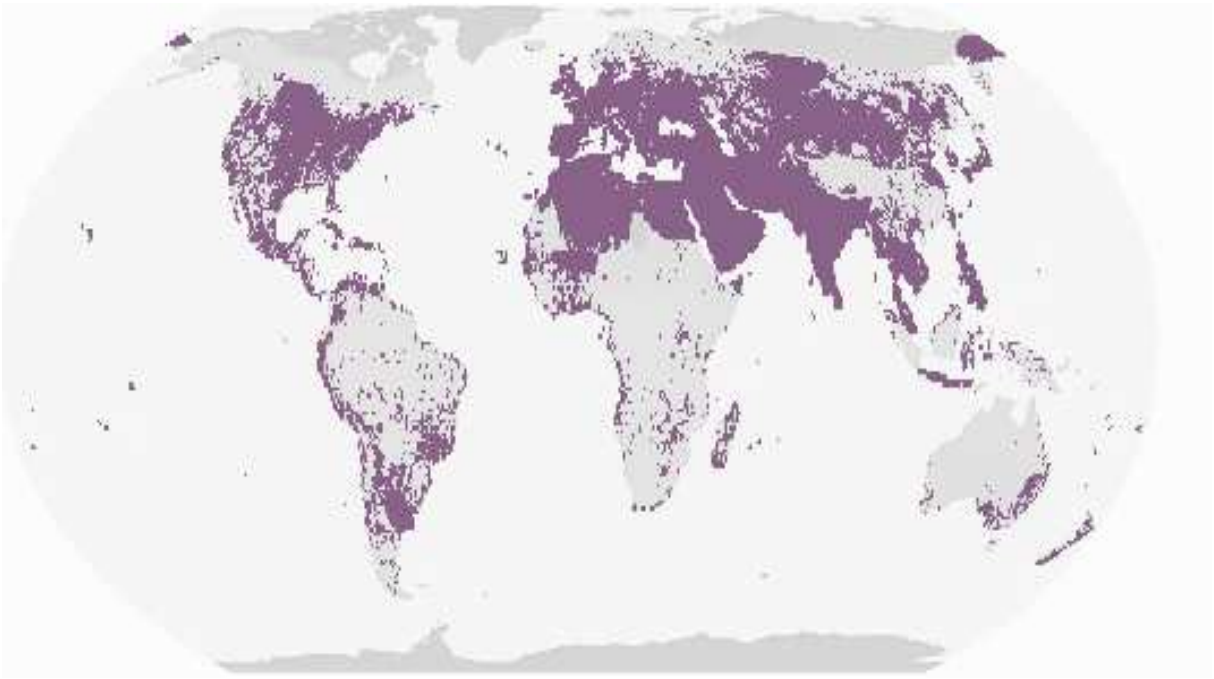


Figure 20. Aire de distribution des pigeons biset dans le monde

(Cornell Lab of Ornithology, 2022)

7.2.2. Habitat et alimentation

Le pigeon biset (*Columbia livia*) se trouve généralement dans son habitat naturel, qui comprend des parois rocheuses, des rebords de grottes et des falaises marines où les oiseaux construisent leurs nids. À l'état sauvage, il cohabite avec l'Homme et est abondant, en particulier dans les zones urbaines. Il préfère éviter les régions où la végétation est dense et élevée. La saison de reproduction varie en fonction de la région. Son régime alimentaire se compose principalement de grains, mais il peut également se nourrir d'invertébrés (Cornell Lab of Ornithology, 2023).

7.2.3. Déplacements

Le pigeon biset se distingue par sa rapidité et son agilité, effectuant fréquemment des mouvements rapides en plein vol. Il vole souvent à très faible altitude au-dessus des champs ou de la surface de l'eau, mais il peut également voler à une grande hauteur, en particulier lors des rassemblements en grandes bandes à partir de l'été (IOC World Bird List (v13.1), Gill, F and D Donsker (Eds), 2023). Des études ont révélé que les trajets effectués par les pigeons dans les environnements urbains,

c'est-à-dire au sein des villes, peuvent varier de 0,3 à 5,3 kilomètres. En revanche, lorsqu'ils se dirigent vers les zones agricoles, leurs trajets de vol peuvent s'étendre sur des distances allant jusqu'à 25 km (Rose et al., 2006).

7.2.4. Antibiorésistance chez les pigeons

Les pigeons urbains constituent ainsi un réservoir important de bactéries cliniquement importantes en raison de leur proximité de l'Homme et des animaux d'élevage. Plusieurs études ont fait état de la présence d'Enterobacterales productrices de BLSE chez ces oiseaux. La plupart de ces études ont été menées au Brésil et au Portugal, et de manière moins fréquente en France. Des BLSE de type CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-15, CTX-M-27 et SHV-12 ont été signalées chez des pigeons dans ces pays avec une fréquence plus élevée de CTX-M-15, tandis que les autres enzymes sont sporadiquement détectées (Bueno et al., 2022a; Cunha et al., 2019; de Oliveira et al., 2018; Freire et al., 2022). La CTX-M-15 a été détectée également dans des pigeons urbains en Bengladesh (Hasan et al., 2014). Quant à l'Afrique, seulement l'Algérie a rapporté des BLSE (CTX-M) (sans identification du variant) dans des pigeons (Loucif et al., 2022c). Les pigeons ont été signalés également comme un réservoir des carbapénémases. En effet, la première détection de carbapénémases chez les pigeons urbains était en 2017 dans une étude réalisée sur les fientes des pigeons urbains collectés en France et en Algérie où les chercheurs ont identifié 16/73 isolats d'*Acinetobacter spp* porteurs de carbapénémases de type OXA-58, OXA-51-like et OXA-23 (Morakchi et al., 2017). Récemment, Loucif *et al.* ont signalé des OXA-48 chez des pigeons urbains en Algérie vivant dans une station d'épuration, une université et un parc public (Loucif et al., 2022a, 2022b). De plus, une MBL de type VIM a été identifiée dans un isolat de *E. coli* dans un pigeon dans le sud du Brésil (Bueno et al., 2022b). Le gène de résistance à la colistine *mcr-1* a également été détecté dans des isolats de *E. coli* identifiés chez des pigeons urbains à proximité d'une station d'épuration en Algérie (Loucif et al., 2022c).

III. Etudes expérimentales

1. Etude de la résistance aux antibiotiques chez les étourneaux

1.1 Résumé

Contexte

La résistance aux antibiotiques représente aujourd'hui une préoccupation majeure, constituant une véritable menace pour la santé publique à l'échelle mondiale. Le concept "One Health" a mis en lumière les zones d'ombre de la compréhension des voies de transmission des bactéries résistantes. Les oiseaux migrateurs sauvages ont suscité un intérêt particulier en raison de leur capacité à propager des bactéries résistantes sur de longues distances, contribuant ainsi à la dissémination globale de la RAM. Dans ce contexte, nous avons décidé d'étudier les étourneaux sansonnets, qui sont des oiseaux migrateurs très répandus, vivant en larges colonies pouvant atteindre plusieurs milliers (voire millions) d'individus. Les étourneaux sont bien connus en Tunisie, d'abord parce qu'ils passent l'hiver dans ce pays, et ensuite parce qu'ils sont chassés pour la consommation humaine. Notre étude visait donc à isoler et à caractériser les Enterobacterales résistantes aux céphalosporines de troisième génération (ESC-R) et aux carbapénèmes (CP-R) présentes dans leur contenu intestinal, afin de déterminer si ces oiseaux sont porteurs de bactéries résistantes qui pourraient être transmises par la chaîne alimentaire à l'Homme ou par contamination fécale aux animaux domestiques et à l'environnement.

Matériel et méthodes

Deux cents étourneaux ont été achetés vivants sur le marché de Sousse, Tunisie, pendant la période légale de chasse entre janvier et février 2022. Ces oiseaux ont été capturés dans différentes régions telles que Bizerte, Zaghouan et Gabès (Figure 21). L'intestin de chaque oiseau a été prélevé et stocké à une température de -20°C. Le contenu intestinal a ensuite été vidé dans un bouillon nutritif, puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. Les cultures obtenues ont été ensemencées sur des milieux MacConkey contenant de la céfotaxime ou de l'imipénème (à une concentration de 2 mg/L), afin de détecter les Enterobacterales ESC-R et CP-R. L'identification des bactéries a été réalisée à l'aide des galeries API20E de bioMérieux.

Les isolats non dupliqués (n=43) ont été testés pour leur sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion des disques selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). Les BLSE ont été détectées par le test de synergie à double disque. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées pour la colistine par micro-dilution en bouillon (EUCAST). L'ADN a été extrait et le génome complet séquencé (Illumina NovaSeq 6000). L'identification a inclus les types de séquence (ST), le sérotype, les gènes de résistance, les facteurs de virulence, le contenu du réplicon et la formule plasmidique à l'aide des outils en ligne de la CGE. L'analyse phylogénétique a été effectuée sur la base du cgMLST. Des séquençages long-reads par MinION ont également été effectués. Les plasmides porteurs de gènes conférant un phénotype BLSE/AmpC ont été caractérisés par des méthodes moléculaires (Southern Blot) et *in silico* (PROKSEE).

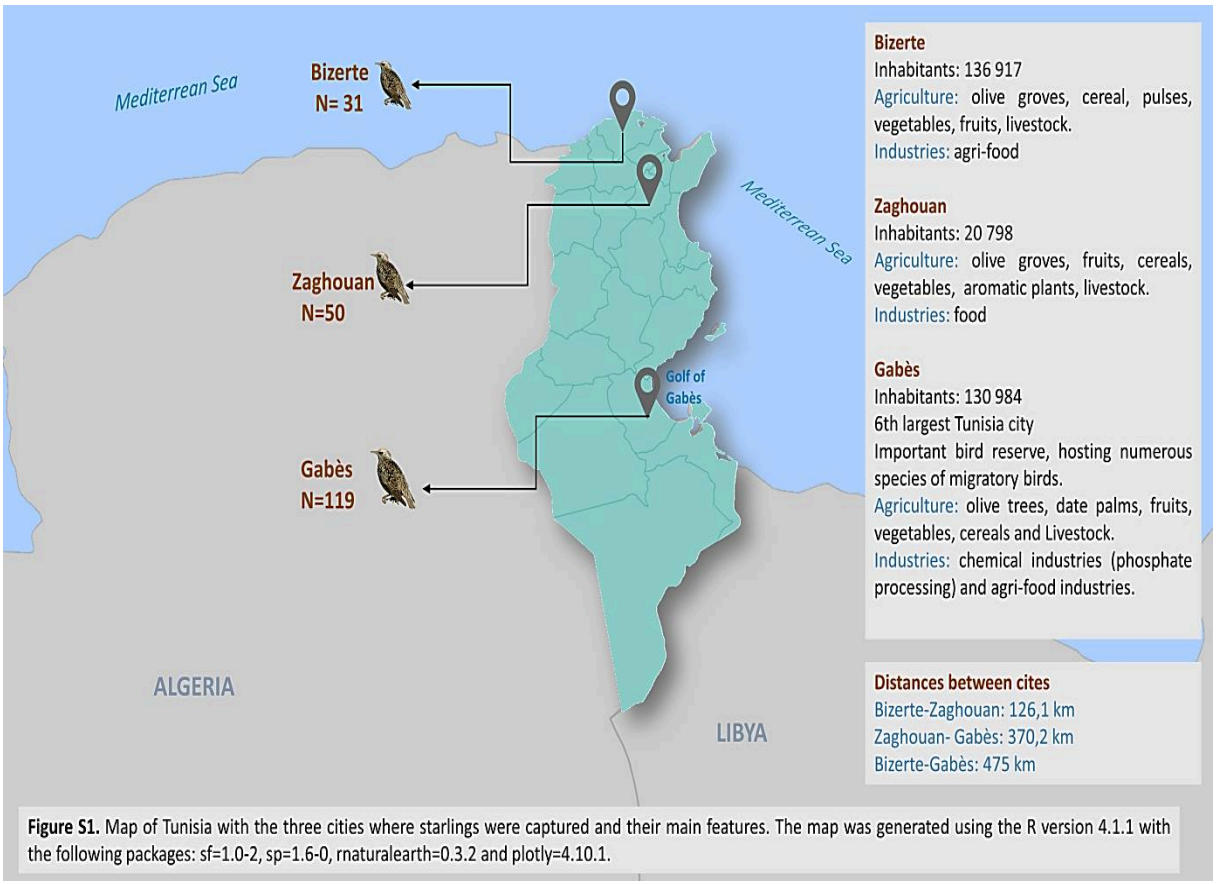


Figure 21. Carte montrant les sites où les étourneaux ont été capturés en Tunisie

Résultats et discussion

Au total, 43 Enterobacterales résistantes aux dernières générations de céphalosporines ont été isolées à partir des 200 échantillons testés (43/200, 21,5%). Les isolats ont été identifiés comme *E. coli* (n=27, 62.8%) et *E. marmotae* (n=16, 37.2%). Vingt-trois isolats (12 *E. coli* et 11 *E. marmotae*; 23/200, 11,5 %) présentaient un phénotype BLSE et 22 (16 *E. coli* et 6 *E. marmotae*; 11 %) un phénotype AmpC, parmi lesquels deux isolats présentaient un phénotype mixte BLSE/AmpC. Le phénotype BLSE était dû à la présence du gène *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ dans tous les isolats d'*E. marmotae*, tandis qu'il était conféré par les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ (n=4), *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ (n=4), *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ (n=3) et *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ (n=1) dans les isolats d'*E. coli*. Les isolats AmpC-positifs présentaient systématiquement le gène *bla*$_{\text{CMY-2}}$, à l'exception d'un isolat d'*E. coli* qui présentait le gène *bla*$_{\text{CMY-62}}$. Un *E. coli* et un *E. marmotae* co-hébergeaient les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ et *bla*$_{\text{CMY-2}}$. D'autres gènes de résistance ont été également identifiés dans ces isolats, tels que les gènes *aph(6)-Id* et *aph(3'')-Ib* (n=22) (*E. coli* (n=11) et *E. marmotae* (n=11)) ou le gène *fosA3* (*E. coli* (n=3) et *E. marmotae* (n=11)). Les gènes *sul1* (n=3), *sul2* (n=7), *sul3* (n=1), *drfA1* (n=2), *drfA17* (n=3), *tet*(A) (n=9) ainsi que le gène *qnrS1* (n=1)) n'ont été identifiés que chez les isolats de *E. coli.* Les isolats de *E. coli* étaient génétiquement très divers étant donné qu'ils appartenaient à 20 STs différents, ce qui indique l'absence de propagation à grande échelle d'un ou de deux clones épidémiques parmi ces oiseaux qui vivent en grands groupes. Seules les ST38, ST155 et ST162 appartenaient à des clones pandémiques à haut risque. Au contraire, les isolats de *E. marmotae* appartenaient très majoritairement à un seul ST, le ST133 (14/16). Ces isolats étaient principalement regroupés en fonction de leur ville d'origine, ce qui suggère fortement des transmissions interindividuelles et des micro-évolutions au niveau de la ville. Différents déterminants génétiques portaient ces gènes de résistance : le gène *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ était porté par un plasmide IncHI2/ST3 dans tous les isolats d'*E. coli* et d'*E. marmotae*, ce qui suggère que ce plasmide peut se propager facilement et de la même manière dans les deux espèces d'*Escherichia*. Ce plasmide était également répandu géographiquement puisqu'il a été isolé dans les trois villes où les oiseaux ont été capturés. Le deuxième déterminant génétique partagé entre *E. coli* et *E. marmotae* était le plasmide IncI1/*bla*$_{\text{CMY-2}}$, qui n'a été identifié qu'à Zaghouan. Ces plasmides ne portaient que le gène *bla*$_{\text{CMY-2}}$, sans autre gène associé conférant une résistance aux antibiotiques autres que les bêta-

lactamines. Cette absence de co-résistance est assez fréquemment observée chez les plasmides de type IncI1, notamment les sous-types IncI1/pST2 (porteurs de CMY-2) ou pST12 et pST3 (porteurs de CTX-M-1). Le fragment IS*Ecp1*-*bla*$_{CMY-2}$-*blc*-*sugE*, qui constitue un environnement génétique commun pour *bla*$_{CMY-2}$, a été trouvé dans tous les plasmides de notre étude. Finalement, d'autres supports génétiques porteurs de BLSE ont été identifiés, tels que les gènes *bla*$_{CTX-M-27}$/IncF/F2:A-:B10, *bla*$_{CTX-M-1}$/IncHI2/ST4 et les gènes *bla*$_{CTX-M-15}$ codés sur le chromosome, mais de manière très sporadique.

Conclusions

Cette étude a révélé de manière surprenante une prévalence élevée d'isolats d'Enterobacterales résistantes aux céphalosporines à spectre étendu chez les étourneaux européens en Tunisie. Il s'agit de la première observation chez cette espèce d'oiseaux en Afrique. Nos résultats ont souligné le rôle crucial d'*E. marmotae*, en particulier de sa lignée ST133, en tant qu'espèce bactérienne commensale porteuse de BLSE/AmpC chez les oiseaux sauvages. Cette constatation s'aligne de manière cohérente avec d'autres rapports récents faisant état de la présence d'*E. marmotae* au sein de la faune sauvage (Liu et al., 2019; Sivertsen et al., 2022; Zhurilov et al., 2023). De plus, nos données suggèrent fortement que le plasmide IncHI2/pST3 peut être transféré de *E. coli* à *E. marmotae* ou inversement. Cette découverte soulève des préoccupations quant à la propagation potentielle de ces plasmides entre les oiseaux sauvages, les animaux domestiques et les humains, par le biais de contacts directs ou d'interactions indirectes, comme la manipulation de viande contaminée.

Dans ce contexte, il devient impératif de mettre en place une surveillance étroite de la résistance aux antibiotiques chez les étourneaux sansonnets en Tunisie. De plus, il est crucial d'amorcer des recherches approfondies afin d'identifier avec précision les sources de contamination de ces oiseaux et de mesurer l'impact réel pour la santé humaine et animale. Ces mesures sont essentielles pour prévenir la propagation de la RAM, tant chez les oiseaux sauvages que dans les écosystèmes dans lesquels ils vivent.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Microbiology Spectrum* en 2023. DOI : https://doi.org/10.1128/spectrum.02220-23

1.2 Article

Microbiology Spectrum

| Veterinary Microbiology | Research Article

Molecular characterization of highly prevalent *Escherichia coli* and *Escherichia marmotae* resistant to extended-spectrum cephalosporins in European starlings (*Sturnus vulgaris*) in Tunisia

Meriem Souguir,[1,2] Pierre Châtre,[2] Antoine Drapeau,[2] Pauline François,[2] Sana Azaiez,[1] Sana Ncir,[1,2] Jean-Yves Madec,[2] Wejdene Mansour,[1] Marisa Haenni[2]

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 10.

ABSTRACT European starlings are widespread migratory birds that have already been described as carrying bacteria resistant to extended-spectrum cephalosporins (ESC-R). These birds are well known in Tunisia because they spend the wintertime in this country and are hunted for human consumption. The goal of our study was to estimate the proportion of ESC-R in these birds and to characterize the collected isolates using whole-genome sequencing. Results showed that 21.5% (42/200) of the birds carried either an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) or an acquired AmpC gene. Diverse $bla_{CTX\text{-}M}$ genes were responsible for the ESBL phenotype, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ being the most prevalent, while only $bla_{CMY\text{-}2}$ was found in AmpC-positive isolates. Likewise, different genetic determinants carried these resistance genes, including IncHI2, and IncF plasmids for $bla_{CTX\text{-}M}$ genes and IncI1 plasmids for $bla_{CMY\text{-}2}$ genes. Three chromosomally encoded $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ genes were also identified. Surprisingly, species identification revealed a large proportion (32.7%) of *Escherichia marmotae* isolates. This species is phenotypically indistinguishable from *Escherichia coli* and has obviously the same capacity to acquire ESC-R genes. Our data also strongly suggest that at least the IncHI2/pST3 plasmid can spread equally between *E. coli* and *E. marmotae*. Given the potential transmission routes between humans and animals, either by direct contact with dejections or through meat preparation, it is important to closely monitor antimicrobial resistance in European starlings in Tunisia and to set up further studies to identify the sources of contamination of these birds.

IMPORTANCE The One Health concept highlighted knowledge gaps in the understanding of the transmission routes of resistant bacteria. A major interest was shown in wild migratory birds since they might spread resistant bacteria over long distances. Our study brings further evidence that wild birds, even though they are not directly submitted to antibiotic treatments, can be heavily contaminated by resistant bacteria. Our results identified numerous combinations of resistance genes, genetic supports, and bacterial clones that can spread vertically or horizontally and maintain a high level of resistance in the bird population. Some of these determinants are widespread in humans or animals (IncHI2/pST3 plasmids and pandemic clones), while some others are less frequent (atypical IncI1 plasmid and minor clones). Consequently, it is essential to be aware of the risks of transmission and to take all necessary measures to prevent the proportions of resistant isolates from increasing uncontrollably.

KEYWORDS *E. marmotae*, starlings, Tunisia, ESBL, AmpC, plasmids, One Health, spread

Antimicrobial resistance (AMR) is a complex phenomenon that knows no barriers and is threatening humans, animals, and the environment worldwide. Enterobacterales

Editor Po-Yu Liu, Taichung Veterans General Hospital, Taichung, Taiwan

Address correspondence to Marisa Haenni, marisa.haenni@anses.fr.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 10.

Received 25 May 2023
Accepted 20 August 2023

Copyright © 2023 Souguir et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

resistant to extended-spectrum cephalosporins (ESC-R) and carbapenems (CP) are among the most significant issues. AMR has long been overlooked in wildlife (1) but, for the last decade, clinically relevant AMR bacteria—including ESC-R and CP-R—have been isolated from various wild bird species on all continents, including vultures, gulls, buzzards, or red kites (2–4). The presence of resistance genes and antibiotic-resistant bacteria in wildlife is most probably an indicator of anthropogenic contamination rather than resistance selection since wild animals are usually not directly exposed to antibiotics (5). Consequently, wild birds can be both reservoirs and spreaders of resistance genes or bacteria of human origin. Moreover, migratory birds, through their movements over long distances, can be partly responsible for the worldwide transmission of resistance genes (6).

Starlings (*Sturnus vulgaris* or European starling) are wild birds native to Europe and South-East Asia that have later reached to North America (7), Australia, New Zealand, and South Africa (8). They are great travelers, migrating over long distances (1,000–1,500 km) searching for food in winter (8). Starlings are so widespread and problematic that they were classified among the three worst invasive birds on the World Conservation Union List (9, 10). They can be potential reservoirs of bacteria as they have been recurrently described as carrying *Campylobacter jejuni* isolates (11, 12). Cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* were also reported from European starlings in Canada, and one ESC-R SHV-12-producing *E. coli* was reported from a Spotless starling in Spain (13–15).

Tunisia is on the migratory route of starlings that are traveling from Europe for the winter season before leaving in spring. During this 6-month period, starlings are traditionally hunted for human consumption and sold alive on local markets. While consumption of meat produced in intensive farms (such as poultry meat) where animals are treated with antibiotics has been widely studied, the risk of consuming wild animal meat has been much less evaluated. Our study thus aimed at isolating and characterizing ESC-R and CP-R Enterobacterales, in order to determine whether these birds carry resistant bacteria, which could be further transmitted through the food chain or by fecal contamination of domestic animals and the environment.

RESULTS

Prevalence and genetic diversity of ESBL/AmpC-producing isolates

Over the 200 samples tested, corresponding to 200 birds, 42 (42/200, 21.5%) presented growth on plates containing cefotaxime, while none of them grew on imipenem-containing plates. One isolate was picked per plate/bird, except for one plate that presented two colony morphologies, leading to a final collection of 43 Enterobacterales.

Isolates were identified as *E. coli* (n = 27, 62.8%) and *Escherichia marmotae* (n = 16, 37.2%). All *E. marmotae* isolates belonged to ST133, except for two presenting a common unknown sequence type (ST) (Table S1; Fig. 1). ST133 isolates were genetically linked and clustered according to their geographical origin; isolates from Gabès were nearly identical with 0–4 SNP differences, but differed by 42 SNPs from the Bizerte isolate and by 192–198 SNPs from the Zaghouan isolates (Table S2; Fig. S1). Only one isolate from Gabès (#60301) was genetically closer to the Bizerte isolate (#60314) than from the other isolates from Gabès. On the contrary, *E. coli* isolates belonged to 20 different sequence types, including 1 unknown and 19 already described STs: ST5451 was found in three different samples, while ST126, ST162, ST973, and ST1177 were each found in two samples. Three strains belonged to the pandemic ST38, ST155, and ST162 clones, and two isolates presented an unknown ST.

ESBL and AmpC resistance genes

Twenty-three isolates (12 *E. coli* and 11 *E. marmotae*; 23/200, 11.5%) displayed an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) phenotype, and 22 (16 *E. coli* and 6 *E. marmotae*; 11%) an AmpC phenotype, among which two isolates presented a mixed

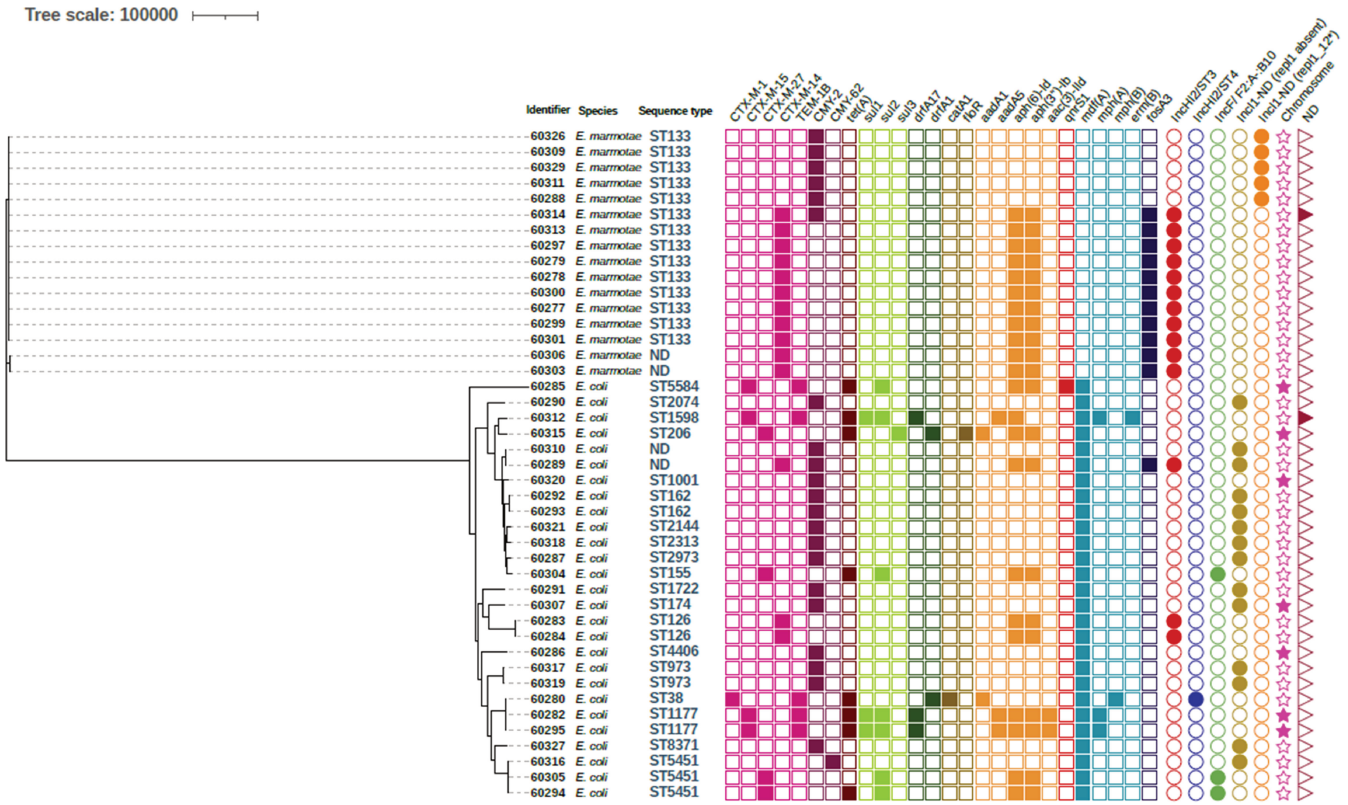


FIG 1 SNP phylogeny of the *E. coli* and *E. marmotae* isolates using iTOL. Two isolates (#60314 and #60289) presented both the $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ and the $bla_{CMY\text{-}2}$ gene. The $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ gene was located on an IncHI2/pST3 plasmid in both isolates, while the $bla_{CMY\text{-}2}$ gene was located on an IncI1 plasmid in isolate #60289 and on an undetermined genetic element in isolate #60314.

ESBL/AmpC phenotype (Table S1). The ESBL phenotype was due to the presence of the $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ gene in all *E. marmotae* isolates, while it was conferred by the $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ (n = 4), $bla_{CTX\text{-}M\text{-}27}$ (n = 4), $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ (n = 3), and $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ (n = 1) genes in *E. coli* isolates (Table S1). AmpC-positive isolates systematically displayed the $bla_{CMY\text{-}2}$ gene, except for one *E. coli* isolate that presented the $bla_{CMY\text{-}62}$ gene. One *E. coli* and one *E. marmotae* co-harbored the $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ and $bla_{CMY\text{-}2}$ genes. The 14 $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$-positive isolates originated from the three cities where birds were caught (Gabès, Bizerte, and Zaghouan), while 20/21 of the $bla_{CMY\text{-}2}$-positive isolates originated from Zaghouan.

Antibiotic susceptibility testing and associated resistance genes

All ESBL-producing isolates presented resistance to non-β-lactam antibiotics, while those only displaying the $bla_{CMY\text{-}2}$ gene were susceptible to all non-β-lactam antibiotics tested (Table S1). *E. marmotae* isolates presented globally less resistance to non-β-lactams than *E. coli*. Streptomycin was the most frequently found resistance in both *E. coli* and *E. marmotae* isolates (51.2%), followed by tetracyclines, sulfonamides, and trimethoprim (25.6%, 23.3%, and 11.6%, respectively). Resistance proportions were less than 5% to enrofloxacin (2.3%) and gentamicin (4.7%) (Table 1). Aminoglycoside resistance was principally due to the co-occurrence of the *aph(6)-Id* and *aph(3″)-Ib* genes (n = 22), in both *E. coli* (n = 11) and *E. marmotae* (n = 11) (Table S1). The *fosA3* gene conferring high-level resistance to fosfomycin was also found in both *E. coli* (n = 3) and *E. marmotae* (n = 11). On the contrary, genes conferring resistance to sulfonamides [*sul1* (n = 3), *sul2* (n = 7), and *sul3* (n = 1)], trimethoprim [*drfA1* (n = 2) and *drfA17* (n = 3)], tetracyclines [*tet*(A), n = 9] as well as quinolones [*qnrS1* (n = 1)] were only identified in *E. coli*. Finally, the *mcr-1* gene present in the ST38 *E. coli* isolate was truncated by the IS*Apl1*, explaining why colistin resistance was not observed.

TABLE 1 Antimicrobial susceptibility phenotypes of all 43 *E. coli* and *E. marmotae* isolates characterized in this study[a]

	Escherichia coli (*n* = 27)		*Escherichia marmotae* (*n* = 16)		Total (*n* = 43)	
	n	%	*n*	%	*n*	%
Amoxicillin	27	100.0	16	100.0	43	100.0
Amoxicillin + clavulanic acid	21	77.8	6	37.5	27	62.8
Ceftiofur	27	100.0	16	100.0	43	100.0
Cefquinome	12	44.4	13	81.25	25	58.1
Ceftazidime	24	88.9	6	37.5	30	69.8
Cefoxitin	17	63.0	5	31.25	22	51.2
Ertapenem	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Sulfonamides	9	33.3	1	6.25	10	23.3
Trimethoprim	5	18.5	0	0.0	5	11.6
Nalidixic acid	7	25.9	0	0.0	7	16.3
Enrofloxacin	1	3.7	0	0.0	1	2.3
Colistin[b]	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Chloramphenicol	4	14.8	0	0.0	4	9.3
Florfenicol	2	7.4	0	0.0	2	4.7
Tetracycline	10	37.0	1	6.25	11	25.6
Gentamicin	2	7.4	0	0.0	2	4.7
Streptomycin	12	44.4	10	62.5	22	51.2
Kanamycin	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Tobramycin	2	7.4	0	0.0	2	4.7
Netilmicin	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Apramycin	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Amikacin	0	0.0	0	0.0	0	0.0

[a]Tests were performed using disc diffusion, except for colistin, for which the minimum inhibitory concentration was determined using broth microdilution.
[b]Determined using the colispot test.

Characterization of the genetic determinants carrying ESBL/AmpC genes

Combined analysis of Southern blots, short-read, and long-read sequences proved that the plasmid-borne $bla_{\text{CTX-M}}$ genes were carried by large IncHI2 or IncF plasmids. The $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene was carried on the chromosome in three isolates, and on an undetermined genetic determinant in the fourth one. All four $bla_{\text{CTX-M-15}}$ genes were preceded by the IS*Ecp1* element and the two chromosomally encoded genes were followed by a tryptophan synthase beta chain gene in a genetic environment similar to the one described by Guenther et al. in the ST38 IMT37356 isolate (16). Alternatively, $bla_{\text{CMY-2}}$ genes were carried either on IncI1 plasmids or on the chromosome.

$bla_{\text{CTX-M-14}}$-carrying plasmids

The $bla_{\text{CTX-M-14}}$ gene, which was found both in *E. coli* (*n* = 3, including two clonal ST126 isolates with no SNP difference) and *E. marmotae* (*n* = 11) isolates, was systematically carried by IncHI2/ST3 plasmids and co-harbored the *fosA3*, *aph(6)-Id*, and *aph(3″)-Ib* genes. Three plasmids were fully sequenced, namely p60283-CTX-M-14 (190,524 bp), p60289-CTX-M-14 (199,906 bp), and p60303-CTX-M-14 (201,374 bp). They were nearly identical with a coverage >97% and presented a GC content of 45.3% (Fig. 2A). The $bla_{\text{CTX-M-14}}$ and *fosA3* genes were identified in the IS*26*-ΔIS*Ecp1*-$bla_{\text{CTX-M-14}}$-ΔIS*903B*-*fosA3*-orf1-Δorf2-IS*26* genetic context, which is identical to the type V *fosA3* surrounding region also identified on an IncHI2/pST3 plasmid by Yang et al. (17). Downstream were the *aph(6)-Id* and *aph(3″)-Ib* genes (also named *strA-strB*), preceded by an IS*903B*-ΔIS*1133* element identical to the one described by Jarocki et al., which was identified on an *E. coli* IncHI2/pST3 plasmid isolated from a piglet in Australia (pF2_18C_HI2; accession

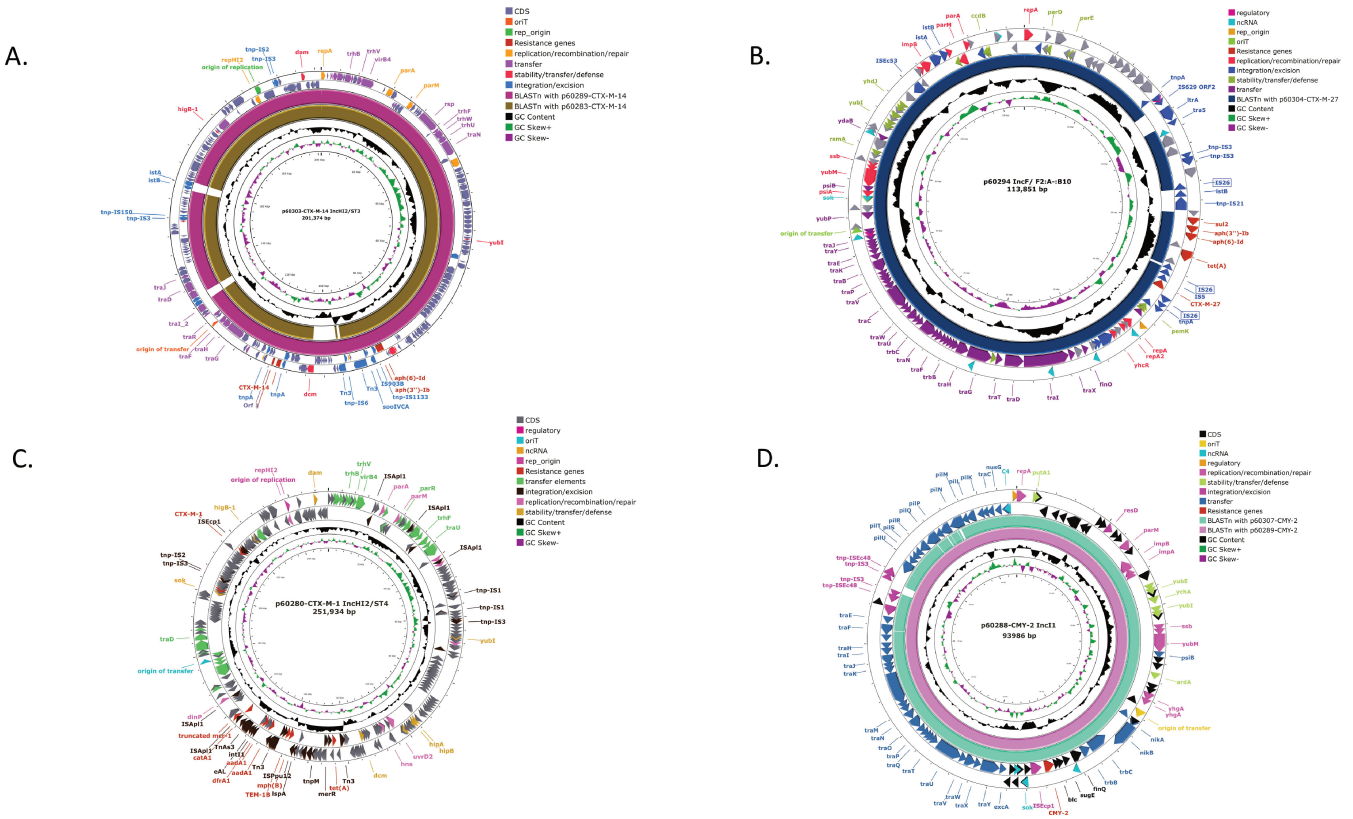


FIG 2 Visualization of the long-read sequenced plasmids carrying the *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ (A), *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ (B), *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ (C), and the *bla*$_{\text{CMY-2}}$ (D) genes using the PROKSEE tool.

number: CP043545.1) (18). The three *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$-carrying plasmids exhibited 99% identity and a 94%–97% coverage with this pF2_18C_HI2 plasmid and with p280_128 (accession number: CP045449.1; *Salmonella enterica* subsp. serovar Schwarzengrund isolates collected from a poultry in Brazil) (19). Both plasmids lacked the *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ and *fosA3* genes, but p280_12888 displayed a *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$ gene (Fig. 3A).

bla$_{\text{CTX-M-27}}$*-carrying plasmids*

The *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ gene was found in four *E. coli* isolates, including the two clonal ST5451 ones (0 SNP difference). It was carried on IncF/F2:A-:B10 plasmids in three isolates and on the chromosome in the fourth one. In this latter isolate, the *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ gene was preceded by an IS*908B* element and the isolate additionally presented the *aadA1*, *aph(6)-Id*, *aph(3″)-Ib*, *tet*(A), *sul3, floR,* and *dfrA1* resistance genes. The two fully sequenced p60294-CTX-M-27 (113,851 bp) and p60304-CTX-M-27 (109,448 bp) were highly similar (>99% identity, GC content around 51.9%) and co-harbored the *aph(6)-Id*, *aph(3″)-Ib*, *tet*(A), and *sul2* resistance genes (Fig. 2B). In both plasmids, the *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ gene was flanked by two copies of the IS*26*, while the downstream IS*26* and a third IS*26* surrounded the *sul2-aph(3″)-Ib-aph(6)-Id-tet*(A) genes. Comparisons with the NCBI database showed that both plasmids shared >95% identity and 99.9% coverage with two plasmids (OX359170.1 and OX359164.1) found in *E. coli* strains isolated from human urine samples in a hospital in Norway (Fig. 3B). These two plasmids contained the same resistance genes found in the plasmids of the present study as well as an additional *sul2* gene and shared the same genetic organization with flanking IS*26* elements.

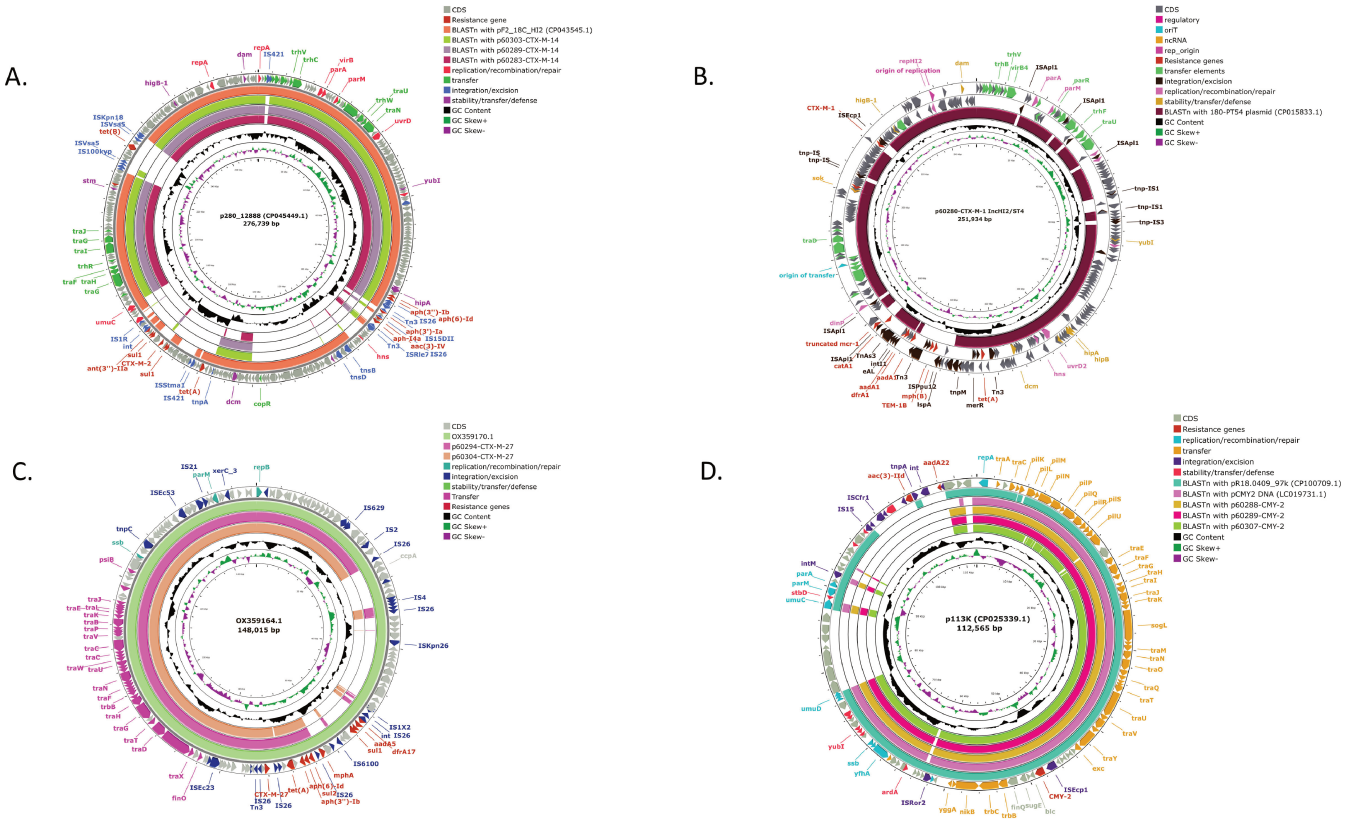


FIG 3 Comparison of plasmids carrying the *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ (A), *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ (B), *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ (C), and the *bla*$_{\text{CMY-2}}$ (D) genes with the closest plasmids found in the publically available databases using the PROKSEE tool.

bla$_{\text{CTX-M-1}}$*-carrying plasmid*

The *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ gene was carried by a large (251,934 bp) IncHI2/ST4 plasmid named p60280-CTX-M-1 which co-harbored the *bla*$_{\text{TEM-1B}}$, *mph*(B), two copies of *aadA1*, *dfrA1*, *catA1*, *tet*(A), and a truncated *mcr-1* gene (Fig. 2C). The *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ gene was preceded by an IS*Ecp1* insertion sequence, but not located close to other resistance genes. p60280-CTX-M-1 shared 99.9% sequence identity and 87% coverage with the 240,662 bp 180-PT54 plasmid (CP015833.1) which was found in an *E. coli* O157 strain isolated from a human fecal sample with diarrhea in 2012 in the United Kingdom (20). The genetic backbones of these two plasmids were similar but they differed in the resistance region, since only the *dfrA1* and *tet*(A) genes were shared (Fig. 3C).

bla$_{\text{CMY-2}}$*-carrying plasmids*

The 21 *bla*$_{\text{CMY-2}}$ genes and the unique *bla*$_{\text{CMY-62}}$ gene were identified in six *E. marmotae* ST133 and 16 *E. coli* belonging to 15 different STs (two isolates belonged to ST162). The *bla*$_{\text{CMY-62}}$-positive ST5451 differed by 17 SNPs from the two *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$-positive ST5451 isolates, while the *E. marmotae* ST133 were identical (0–5 SNPs) when originating from the same city and differed by nearly 200 SNPs when originating from Zaghouan or Bizerte (Table S2). Isolates were all devoid of additional resistance genes, except 16 isolates which carried the chromosomally encoded *mdf*(A) gene, and two (one *E. coli* and one *E. marmotae*) which carried the *aph(6)-Id*, *aph(3″)-Ib,* and *fosA3* genes, together with the *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ gene, on an additional IncHI2 plasmid. Seventeen *bla*$_{\text{CMY-2}}$ genes and the *bla*$_{\text{CMY-62}}$ gene were carried on ca. 90 kbp IncI1 plasmids, three *bla*$_{\text{CMY-2}}$ genes were chromosomally encoded (#60286, #60307, and #60320), while the genetic determinant of the last *bla*$_{\text{CMY-2}}$ gene could not be determined (Table S1; Fig. 1). All

IncI1 plasmids from *E. coli* were untypable since they lacked the *repI1* gene, while those from *E. marmotae* presented an unknown repI1 allele close to repI1_12. The four other pMLST alleles were identical in all *E. marmotae* and *E. coli* isolates and belonged to the 29/15/11/3 allelic profile.

Three IncI1 plasmids were fully sequenced, which showed 99% identity over their total length and a GC content of 49.4% (Fig. 2D). The AmpC gene was found on an IS*Ecp1-bla*$_{CMY-2}$-*blc-sugE* fragment (3,735 bp) integrated in the *finQ* gene, a fragment also observed in Illumina sequences from other *bla*$_{CMY-2}$-positive isolates. These plasmids shared 99% identity over up to 90% of their length with p113k (CP025339.1), pR18.0409_97k (CP100709.1), and pCMY2_DNA (LC019731.1). p113k and pR18.0409_97k were both isolated from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, the first one from a sick pig (*Sus scrofa domesticus*) (21) and the second one from a human stool sample, while pCMY2_DNA was found in an *E. coli* from human stool (22) (Fig. 3D). These three plasmids carried a *bla*$_{CMY-2}$ gene, presented a pMLST closely related to our starling isolates (1/4/15/11/3 assigned to pST217 for p113k; 2/3/15/11/3 for pCMY2_DNA; and 1/4/15/11/2 assigned to pST52 for pR18.0409_97k) and all originated from Taiwan.

DISCUSSION

ESC-R *E. coli* have spread in all One Health sectors including wildlife (23), so that they have become a key indicator in the global monitoring of AMR and a marker of environmental contamination related to human activity (24–26). ESBL-producing *E. coli* isolates were first described from wild birds in 2006 in Portugal (27) and numerous cases from a wide variety of bird species have been reported since then throughout the world (28). In this study, we observed a high prevalence of ESC-R *Escherichia* spp. isolates (21.5%) in European starlings, due to the presence of both ESBL-conferring (11.5%) and AmpC-conferring (11.0%) resistance genes. However, the origin of these resistance genes and resistant bacteria remains unknown; indeed, they might have been acquired in Tunisia as well as on the birds' migratory routes. This is the first description of ESC-R-positive European starlings in North Africa, after their report in North America where 4% of the birds tested were ESC-resistant (13), and the detection of one SHV-12-positive *E. coli* in a Spotless starling in Spain (15). The carriage of ESC-R determinants in these widespread migratory birds is of concern and further studies are needed to decipher the routes of contamination, including through meat consumption, and the risk of contamination for humans and animals in contact. Also, other factors that play an important role in the evolution of the bird microbiota, such as diet, sex, age, feeding habits, and geographical location—which were not recorded here and are often overlooked—should be taken into account in future studies.

Here, 62.8% of the isolates were identified as *E. coli* (n = 27). These isolates were genetically highly diverse since they belonged to 20 different STs, indicating the absence of the large-scale spread of one or two successful clones among these birds that live in large groups. Only ST38, ST155, and ST162 belonged to pandemic clones. The remaining 37.2% were identified as *E. marmotae,* among which 14/16 belonged to ST133. These isolates mainly clustered according to their city of origin, differing by 0–5 SNPs when originating from the same city and by 45 or 198 SNPs when originating from different cities (Table S2). This strongly suggests inter-individual transmissions and micro-evolutions at the city level. Only one *E. marmotae* from Gabès (#60313) clustered with the unique isolate collected from Bizerte (#60314); this genetic proximity cannot be explained since the two cities are 475 km apart. *E. marmotae*, renamed in 2015 after its host *Marmota himalayana* (29)*,* was formerly known as *E.coli* cryptic clade V, a clade especially associated with birds (30). This new species, which is phenotypically identical to *E. coli*, has since then been reported as a *bla*$_{CTX-M-1}$ carrier from an Alpine marmot in a Belgian zoo (31), and as a *bla*$_{CTX-M-32}$ carrier from a red deer in Poland (32); these reports, in addition to the starlings' samples here, suggest that wild animals are preferential hosts of *E. marmotae*. A recent publication analyzing the genomes of 41 *E. marmotae* isolates suggested that this species can be pathogenic for humans but is still carrying few

resistance determinants, even if sporadic cases of ESBL- and carbapenemase-producing isolates were reported (33). Our study revealed that *E. marmotae* can be a frequent carrier of AmpC- and ESBL-conferring genes that can be shared with *E. coli* isolates present in the same niche.

The ESBL phenotype was due to the presence of four different genes ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$, and $bla_{CTX\text{-}M\text{-}27}$) but only $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ was identified in *E. marmotae*. The $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ gene was carried by an IncHI2/ST3 plasmid in all *E. coli* and *E. marmotae* isolates, suggesting that this plasmid can spread easily and equally in both *Escherichia* species. This plasmid was also geographically widespread since it has been isolated in all three cities where birds were captured, even though it was much less present in Zaghouan. The backbone of this IncHI2 plasmid has already been described in *E. coli* and *Salmonella* Schwarzengrund isolates displaying different resistance genes. The resistance gene modules *aph(6)-Id-aph(3″)-Ib* and $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$*-fos3* described here were each flanked by insertion sequences and displayed genetic organizations already identified in other non-identical IncHI2/pST3 plasmids, indicating the plasticity of the resistance region. The presence of the *fosA3* gene is of concern since fosfomycin is one of the last resort antibiotics to treat carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. The *fosA3* gene has often been associated with ESBL-conferring genes (34), including on IncHI2 plasmids in the same genetic context as described here in both *E. coli* and *E. marmotae* (17, 35), but it has only been reported twice in wild birds: in a German black kite and a frigate bird in a pristine Brazilian atoll (36, 37). Its presence in migratory birds living in large colonies favoring close contacts and genetic transfers should thus be monitored.

The second genetic determinants shared between *E. coli* and *E. marmotae* were the IncI1/$bla_{CMY\text{-}2}$ plasmids, which have only been identified in Zaghouan. These plasmids only carried the $bla_{CMY\text{-}2}$ gene with no additional gene conferring resistance to non-β-lactam antibiotics, as often seen in IncI1/pST2 and pST12 subtypes (38). The IS*Ecp1*-$bla_{CMY\text{-}2}$*-blc-sugE* fragment, which is a common genetic environment for $bla_{CMY\text{-}2}$, was always found in the *finQ* gene (38, 39). All plasmids were genetically highly similar, except that those identified in *E. coli* lacked the *repI1* allele. Given the rare allelic profile identified in both *E. coli* and *E. marmotae* for the four other genes of the pMLST scheme, we can hypothesize that the IncI1 plasmid with the complete pMLST profile is the common ancestor, which then underwent recombination and excision before spreading in *E. coli*. Interestingly, plasmids showing the closest pMLST types all originated from humans or pigs in Taiwan, except two originating from a dog in the UK and from an unknown origin in Sweden.

In conclusion, our study revealed a surprisingly high prevalence of ESC-R isolates in European starlings in Tunisia. This was mostly due to the epidemic success of the $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$/IncHI2/pST3 mostly in Bizerte and Gabès, and $bla_{CMY\text{-}2}$/IncI1 plasmids exclusively in Zaghouan. In addition, a few more sporadic resistance determinants were found, such as $bla_{CTX\text{-}M\text{-}27}$/IncF/F2:A-:B10, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/IncHI2/ST4, and the chromosomally encoded $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ genes. Our results also highlighted the importance of *E. marmotae*—and notably the ST133 lineage—as an ESC-R commensal bacterial species in wild birds, in coherence with other reports of *E. marmotae* in wildlife. The absence of data on the resistance genes/plasmids found in humans, animals, and the environment of these three cities, and especially in the olive farms that are seasonally invaded by starlings, is a limitation of this study—as well as a potential perspective for further studies, since the real risk of AMR transmission cannot be assessed.

MATERIALS AND METHODS

Wild birds sampling and bacterial isolation

Wild birds (n = 200) were purchased alive on the Sousse market, Tunisia, between January and February 2022 during the legal hunting period. Birds were caught in Bizerte,

Zaghouan, or Gabès (Fig. S1), and kept in aviaries for as short a time as possible, without being fed. The intestine of each bird was collected immediately after the death of the bird using a sterile scalpel and stored at −20°C. Intestinal content was emptied in 10 mL of Trypto-casein soy broth (Biokar), homogenized and incubated for 18–24 h at 37°C. Overnight cultures were inoculated on selective MacConkey agar plates supplemented with cefotaxime or imipenem (2 mg/L), for the detection of ESC- or CP-resistant Enterobacterales. One colony per morphology and per plate was picked up. Identification was performed using API20E galleries (bioMérieux).

Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing was performed on all 43 non-duplicate *E. coli* and *E. marmotae* using the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar, according to the guidelines and clinical breakpoints of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM; www.sfm-microbiologie.org). The *E. coli* ATCC 25922 strain was used as quality control. A total of 16 β-lactam (amoxicillin, piperacillin, ticarcillin, amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, cefalotin, cefuroxime, cefotaxime, ceftiofur, ceftazidime, cefoxitin, cefepime, cefquinome, aztreonam, and ertapenem) and 14 non-β-lactam (tetracycline, kanamycin, tobramycin, gentamicin, amikacin, apramycin, netilmicin, streptomycin, florfenicol, chloramphenicol, sulfonamides, trimethoprim, nalidixic acid, and enrofloxacin) antibiotics was tested. ESBL producing Enterobacterales were detected using the Double Disc Synergy Test. Minimum inhibitory concentrations were determined by broth microdilution for colistin, according to the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing.

Illumina short-read sequencing and data analyses

DNA was extracted using the NucleoSpin Microbial DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) and sequencing was performed on a NovaSeq 6000 instrument (Illumina, San Diego, CA, USA). Quality control of the reads was performed using FastQC and low-quality sequences were trimmed using Trimmomatic v0.39. *De novo* assembly was performed using Shovill v1.0.4 and the quality of assemblies was assessed using QUAST v5.0.2 (Table S3). Identification was performed using Kraken (https://github.com/DerrickWood/kraken), STs according to Achtman's MLST scheme, resistance genes and virulence factors were determined using the CGE online tools (http://www.genomicepidemiology.org/) MLSTFinder v2.0, ResFinder v4.1, and VirulenceFinder 2.0.3, while replicon content and plasmid formula were identified using PlasmidFinder 2.0.1 and pMLST 2.0. Serotypes were determined using SeroTypeFinder2.0. Detection of the phylogenetic groups of each *E. coli* isolate was performed *in silico* using Clermontyping online tool (http://clermontyping.iame-research.center/). The phylogenetic analysis was performed using Roary v.3.11.0 as already described (40). Pairwise SNP distances were calculated from core genome alignments generated by Roary using snp-dists (https://github.com/tseemann/snp-dists) (Table S2). Visualizing was performed using iTOL v6.5.2 (https://itol.embl.de/).

MinION long-read sequencing

MinION long-read sequencing libraries were prepared according to the Oxford Nanopore Technologies using the native barcoding expansion kit (EXP-NBD104) and the ligation sequencing kit (SQK-LSK109). Sequencing was performed on a MinION sequencer using a SpotON Mk 1 R9 version flow cell (FLO-MIN106D). Assembly of both Illumina and Nanopore reads was performed using Unicycler. The assembled contigs were annotated using Bakta (Web version 1.7.0/DB: 5.0.0) (41).

Characterization of plasmids

Molecular characterization

The genetic determinants carrying the ESBL/AmpC genes were detected by Southern blot on *I-Ceu*1- or S1-digested DNA PFGE gels as already described (42), using the DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions.

In silico characterization

The PROKSEE server (https://proksee.ca/) was used to generate high-quality navigable maps of each circular plasmid described and the visualization of genetic environment of chromosomal genes (43). Circular comparison between the plasmids belonging to the same incompatibility group and the closest plasmids found in the NCBI database was carried out on the PROKSEE server using BLAST analysis (BLAST+ 2.12.0).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES) and by the PHC-Utique/Campus France (AMR1Health, grant no. 46213QA).

AUTHOR AFFILIATIONS

[1]Laboratoire de Recherche Biophysique Métabolique et Pharmacologie Appliquée, Faculté de Médecine Ibn Al Jazzar Sousse, Université de Sousse, Sousse, Tunisia
[2]Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, ANSES, Université de Lyon, Lyon, France

FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES)		Marisa Haenni
Campus France (Agence Française pour la Promotion de l'Enseignement Supérieur, l'Accueil et la Mobilité Internationale)	46213QA	Meriem Souguir

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Meriem Souguir, Investigation, Methodology, Writing – original draft | Pierre Châtre, Investigation, Methodology | Antoine Drapeau, Software | Pauline François, Software | Sana Azaiez, Investigation | Sana Ncir, Investigation | Jean-Yves Madec, Funding acquisition, Supervision, Writing – review and editing | Wejdene Mansour, Conceptualization, Project administration, Supervision, Writing – review and editing.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The project was deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under the BioProject accession number PRJNA976065.

ADDITIONAL FILES

The following material is available online.

Supplemental Material

Fig. S1 (Spectrum02220-23-s0001.tif). Map of the sampling.

Table S1 (Spectrum02220-23-s0002.xlsx). List and characteristics of all *E. coli* and *E. marmotae* strains.

Table S2 (Spectrum02220-23-s0003.xlsx). SNP distances between all *E. coli* and *E. marmotae* isolates.

Table S3 (Spectrum02220-23-s0004.xlsx). Quality controls of all *E. coli* and *E. marmotae* data.

REFERENCES

1. Dolejska M, Literak I. 2019. Wildlife is overlooked in the epidemiology of medically important antibiotic-resistant bacteria. Antimicrob Agents Chemother 63:e01167-19. https://doi.org/10.1128/AAC.01167-19
2. Blanco G, López-Hernández I, Morinha F, López-Cerero L. 2020. Intensive farming as a source of bacterial resistance to antimicrobial agents in sedentary and migratory vultures: implications for local and transboundary spread. Sci Total Environ 739:140356. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140356
3. Vittecoq M, Laurens C, Brazier L, Durand P, Elguero E, Arnal A, Thomas F, Aberkane S, Renaud N, Prugnolle F, Solassol J, Jean-Pierre H, Godreuil S, Renaud F. 2017. VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* in gulls from southern France. Ecol Evol 7:1224–1232. https://doi.org/10.1002/ece3.2707
4. Guenther S, Aschenbrenner K, Stamm I, Bethe A, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Batsajkhan N, Glupczynski Y, Wieler LH, Ewers C. 2012. Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. PLoS One 7:e53039. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053039
5. Ramey AM, Ahlstrom CA. 2020. Antibiotic resistant bacteria in wildlife: perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. J Wildl Dis 56:1–15.
6. Wang J, Ma Z-B, Zeng Z-L, Yang X-W, Huang Y, Liu J-H. 2017. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. Zool Res 38:212. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.024
7. Hofmeister NR, Werner SJ, Lovette IJ. 2021. Environmental correlates of genetic variation in the invasive European starling in North America. Mol Ecol 30:1251–1263. https://doi.org/10.1111/mec.15806
8. Linz GM, Homan HJ, Gaulker SM, Penry LB, Bleier WJ. 2007. European starlings: a review of an invasive species with far-reaching impacts. Managing vertebrate invasive species 24
9. Bodt LH, Rollins LA, Zichello JM. 2020. Contrasting mitochondrial diversity of European starlings (*Sturnus vulgaris*) across three invasive continental distributions. Ecol Evol 10:10186–10195. https://doi.org/10.1002/ece3.6679
10. Lowe S, Browne M, Boudjelas S, Poorter M. 2002. 100 of the world's worst invasive alien species, a selection from the global invasive species database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN).
11. Cabe PR. 2021. European Starlings (*Sturnus vulgaris*) as vectors and reservoirs of pathogens affecting humans and domestic livestock. Animals (Basel) 11:466. https://doi.org/10.3390/ani11020466
12. Colles FM, McCarthy ND, Howe JC, Devereux CL, Gosler AG, Maiden MCJ. 2009. Dynamics of *Campylobacter* colonization of a natural host, *Sturnus vulgaris* (European starling). Environ Microbiol 11:258–267. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01773.x
13. Chandler JC, Anders JE, Blouin NA, Carlson JC, LeJeune JT, Goodridge LD, Wang B, Day LA, Mangan AM, Reid DA, Coleman SM, Hopken MW, Bisha B. 2020. The role of European starlings (*Sturnus vulgaris*) in the dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* among concentrated animal feeding operations. Sci Rep 10:11978. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68365-9
14. Medhanie GA, Pearl DL, McEwen SA, Guerin MT, Jardine CM, Schrock J, LeJeune JT. 2017. Spatial clustering of *Escherichia coli* with reduced susceptibility to cefotaxime and ciprofloxacin among dairy cattle farms relative to European starling night roosts. Zoonoses Public Health 64:204–212. https://doi.org/10.1111/zph.12296
15. Alcalá L, Alonso CA, Simón C, González-Esteban C, Orós J, Rezusta A, Ortega C, Torres C. 2016. Wild birds, frequent carriers of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 types. Microb Ecol 72:861–869. https://doi.org/10.1007/s00248-015-0718-0
16. Guenther S, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Wieler LH, Schaufler K. 2017. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. J Antimicrob Chemother 72:1310–1313. https://doi.org/10.1093/jac/dkx006
17. Yang X, Liu W, Liu Y, Wang J, Lv L, Chen X, He D, Yang T, Hou J, Tan Y, Xing L, Zeng Z, Liu JH. 2014. F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55/\text{-}14/\text{-}65}$ in *Escherichia coli* from chickens in China. Front Microbiol 5:688. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00688
18. Jarocki VM, Reid CJ, Chapman TA, Djordjevic SP. 2019. *Escherichia coli* ST302: genomic analysis of virulence potential and antimicrobial resistance mediated by mobile genetic elements. Front Microbiol 10:3098. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03098
19. Galetti R, Filho R, Ferreira JC, Varani AM, Sazinas P, Jelsbak L, Darini ALC. 2021. The plasmidome of multidrug-resistant emergent *Salmonella* serovars isolated from poultry. Infect Genet Evol 89:104716. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104716
20. Cowley LA, Dallman TJ, Fitzgerald S, Irvine N, Rooney PJ, McAteer SP, Day M, Perry NT, Bono JL, Jenkins C, Gally DL. 2016. Short-term evolution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 between two food-borne outbreaks. Microb Genom 2:e000084. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000084
21. Hong YP, Wang YW, Huang IH, Liao YC, Kuo HC, Liu YY, Tu YH, Chen BH, Liao YS, Chiou CS. 2018. Genetic relationships among multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains from humans and animals. Antimicrob Agents Chemother 62:e00213-18. https://doi.org/10.1128/AAC.00213-18
22. Lin Y-T, Pan Y-J, Lin T-L, Fung C-P, Wang J-T. 2015. Transfer of CMY-2 cephalosporinase from *Escherichia coli* to virulent *Klebsiella pneumoniae* causing a recurrent liver abscess. Antimicrob Agents Chemother 59:5000–5002. https://doi.org/10.1128/AAC.00492-15
23. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. 2011. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? Front Microbiol 2:246. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00246
24. Ewbank AC, Fuentes-Castillo D, Sacristán C, Esposito F, Fuga B, Cardoso B, Godoy SN, Zamana RR, Gattamorta MA, Catão-Dias JL, Lincopan N. 2022. World health organization critical priority *Escherichia coli* clone ST648 in magnificent frigatebird (*Fregata magnificens*) of an uninhabited insular environment. Front Microbiol 13:940600. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.940600
25. Haenni M, Dagot C, Chesneau O, Bibbal D, Labanowski J, Vialette M, Bouchard D, Martin-Laurent F, Calsat L, Nazaret S, Petit F, Pourcher A-M, Togola A, Bachelot M, Topp E, Hocquet D. 2022. Environmental contamination in a high-income country (France) by antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes: status and possible causes. Environ Int 159:107047. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107047
26. WHO.2021. WHO integrated global surveillance on ESBL-producing *E. coli* using a "One Health" approach: implementation and opportunities. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/340079.
27. Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C. 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes

in faecal samples of wild animals in Portugal. J Antimicrob Chemother 58:1311–1312. https://doi.org/10.1093/jac/dkl415
28. Palmeira JD, Cunha MV, Carvalho J, Ferreira H, Fonseca C, Torres RT. 2021. Emergence and spread of cephalosporinases in wildlife: a review. Animals (Basel) 11:1765. https://doi.org/10.3390/ani11061765
29. Liu S, Jin D, Lan R, Wang Y, Meng Q, Dai H, Lu S, Hu S, Xu J. 2015. *Escherichia marmotae* sp. nov., isolated from faeces of *Marmota himalayana*. Int J Syst Evol Microbiol 65:2130–2134. https://doi.org/10.1099/ijs.0.000228
30. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. 2011. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. Environ Microbiol 13:2468–2477. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x
31. De Witte C, Vereecke N, Theuns S, De Ruyck C, Vercammen F, Bouts T, Boyen F, Nauwynck H, Haesebrouck F. 2021. Presence of broad-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in zoo mammals. Microorganisms 9:834. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040834
32. Nüesch-Inderbinen M, Tresch S, Zurfluh K, Cernela N, Biggel M, Stephan R. 2022. Finding of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacterales in wild game meat originating from several European countries: predominance of *Moellerella wisconsensis* producing CTX-M-1, November 2021. Euro Surveill 27:2200343. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.49.2200343
33. Sivertsen A, Dyrhovden R, Tellevik MG, Bruvold TS, Nybakken E, Skutlaberg DH, Skarstein I, Kommedal Ø. 2022. *Escherichia marmotae* - a human pathogen easily misidentified as *Escherichia coli*. Microbiol Spectr 10:e0203521. https://doi.org/10.1128/spectrum.02035-21
34. Zurfluh K, Treier A, Schmitt K, Stephan R. 2020. Mobile fosfomycin resistance genes in Enterobacteriaceae-an increasing threat. MicrobiologyOpen 9:e1135. https://doi.org/10.1002/mbo3.1135
35. Freitag C, Michael GB, Li J, Kadlec K, Wang Y, Hassel M, Schwarz S. 2018. Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. Vet Microbiol 219:63–69. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.028
36. Ewbank AC, Fuentes-Castillo D, Sacristán C, Cardoso B, Esposito F, Fuga B, de Macedo EC, Lincopan N, Catão-Dias JL. 2022. Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* survey in wild seabirds at a pristine atoll in the southern Atlantic ocean, Brazil: first report of the O25b-ST131 clone harboring blaCTX-M-8. Sci Total Environ 806:150539. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150539
37. Villa L, Guerra B, Schmoger S, Fischer J, Helmuth R, Zong Z, García-Fernández A, Carattoli A. 2015. IncA/C plasmid carrying bla_{NDM-1}, bla_{CMY-16}, and *fosA3* in a *Salmonella enterica* serovar Corvallis strain isolated from a migratory wild bird in Germany. Antimicrob Agents Chemother 59:6597–6600. https://doi.org/10.1128/AAC.00944-15
38. Pietsch M, Irrgang A, Roschanski N, Brenner Michael G, Hamprecht A, Rieber H, Käsbohrer A, Schwarz S, Rösler U, Kreienbrock L, Pfeifer Y, Fuchs S, Werner G, RESET Study Group. 2018. Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. BMC Genomics 19:601. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4976-3
39. Hansen KH, Bortolaia V, Nielsen CA, Nielsen JB, Schønning K, Agersø Y, Guardabassi L. 2016. Host-specific patterns of genetic diversity among IncI1-Igamma and IncK plasmids encoding CMY-2 beta-lactamase in *Escherichia coli* isolates from humans, poultry meat, poultry, and dogs in Denmark. Appl Environ Microbiol 82:4705–4714. https://doi.org/10.1128/AEM.00495-16
40. Al-Mir H, Osman M, Drapeau A, Hamze M, Madec JY, Haenni M. 2021. Spread of ESC-, carbapenem- and colistin-resistant *Escherichia coli* clones and plasmids within and between food workers in Lebanon. J Antimicrob Chemother 76:3135–3143. https://doi.org/10.1093/jac/dkab327
41. Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A. 2021. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. Microb Genom 7:000685. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685
42. Saidani M, Messadi L, Chaouechi A, Tabib I, Saras E, Soudani A, Daaloul-Jedidi M, Mamlouk A, Ben Chehida F, Chakroun C, Madec JY, Haenni M. 2019. High genetic diversity of Enterobacteriaceae clones and plasmids disseminating resistance to extended-spectrum cephalosporins and colistin in healthy chicken in Tunisia. Microb Drug Resist 25:1507–1513. https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0138
43. Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen C, Graham M, Van Domselaar G, Stothard P. 2023. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 51:W484–W492. https://doi.org/10.1093/nar/gkad326

2. Etude de la résistance aux antibiotiques chez les pigeons

2.1 Résumé

Contexte

Les oiseaux sauvages ont été identifiés comme des sentinelles, des réservoirs et des vecteurs potentiels de la RAM. Les oiseaux péri-domestiques tels que les pigeons urbains (*Columba livia*) présentent un intérêt pour la santé publique en raison de leur proximité avec les humains et de leurs interactions avec le bétail et la faune sauvage. Les pigeons ont été signalés comme étant un réservoir important de nombreux agents pathogènes et des bactéries résistantes d'importance clinique majeure, ce qui représente un risque potentiellement important pour la santé humaine. C'est dans ce contexte que notre étude a été menée, dans le but d'isoler et de caractériser moléculairement les bactéries résistantes présentes dans le microbiote intestinal des pigeons urbains sauvages collectés dans deux villes tunisiennes. Cette recherche vise à estimer la proportion d'isolats résistants ainsi que leur diversité chez les pigeons en Tunisie et à évaluer les implications potentielles pour la santé publique.

Matériel et Méthodes

Des pigeons sauvages vivant en liberté (n=206) ont été collectés entre avril 2021 et mai 2023 à Sousse et Monastir, en Tunisie. Les échantillons ont été obtenus soit à l'aide d'écouvillons cloacaux lorsque les oiseaux ont été capturés (n=66), soit en collectant des fientes fraîches directement après qu'elles ont été déposées lorsque les oiseaux n'ont pas pu être capturés (n=140). A Sousse, 178 pigeons ont été échantillonnés, provenant de quatre fermes d'animaux de rente (fermes 1 à 4 ; n=74), ou vivant en ville près de la faculté de médecine de Sousse et de l'hôpital universitaire Farhat Hached (n=104). A Monastir, 28 pigeons ont été collectés dans trois fermes (fermes 5 à 7). Les pigeons sauvages vivants dans les fermes étaient libres de se déplacer à l'intérieur et à l'extérieur des fermes et se trouvaient à proximité d'autres animaux. La sélection de bactéries Gram-négatif résistantes aux céphalosporines de dernière génération ou aux carbapénèmes a été effectuée à l'aide d'une culture sélective sur gélose MacConkey additionnée de céfotaxime ou d'imipénème (3 mg/L). Une colonie par morphologie a été prélevée. L'identification a été réalisée à l'aide des galeries API20E et API20NE (bioMérieux). Les souches

obtenues ont été par la suite testées pour leur sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). Les BLSE ont été détectées par le test de synergie à double disque. L'ADN a été extrait à l'aide du kit d'extraction d'ADN microbien NucleoSpin (Macherey-Nagel) et le séquençage short-read a été effectué sur un instrument NovaSeq 6000 (Illumina). L'analyse génomique à l'aide des outils en ligne de la CGE a inclus l'identification des types de séquence (ST), du sérotype, des gènes de résistance, des facteurs de virulence, du contenu en réplicon et de la formule plasmidique. L'analyse phylogénétique a été effectuée par cgMLST. Des séquençages longs-reads MinION ont été effectués sur une sélection de souches (un isolat représentatif de chaque clone) pour la caractérisation des plasmides portant les gènes de résistance. Les plasmides porteurs de gènes conférant un phénotype BLSE/AmpC ont été caractérisés par des méthodes moléculaires (Southern Blot) et *in silico* (PROKSEE).

Résultats et discussion

Sur les 206 échantillons de pigeons testés, 14 (14/206, 6,8 %) ont présenté une croissance sur la gélose MacConkey contenant du céfotaxime, et deux (2/206, 1,0 %) sur gélose MacConkey contenant de l'imipenème. Tous les oiseaux positifs vivaient dans 4 fermes différentes à Sousse et à Monastir. En revanche, aucun des oiseaux échantillonnés en ville et à proximité d'un hôpital n'a présenté d'isolats résistants, ce qui suggère que la contamination dans ces zones n'était pas suffisante pour que les bactéries résistantes soient transmises aux pigeons. Au total 18 isolats étaient résistants. Ces isolats ont été identifiés comme 16 Enterobacterales, dont 11 *E. coli* et une *K. pneumoniae* avec un phénotype BLSE (12/206, 5,8 %), quatre *Enterobacter hormaechei* avec une hyperproduction de AmpC et deux *Pseudomonas putida* résistants à l'imipénème. Le pourcentage de BLSE produites par les *E. coli* reporté dans les pigeons en Tunisie diffère de ce qui a été observé dans d'autres études internationales. Ces différences peuvent être attribuées à de multiples facteurs, notamment les méthodologies, les variations géographiques, les niveaux d'urbanisation et la contamination des environnements. Trois STs ont été identifiées parmi les isolats d'*E. coli.* ST5584 (n=3) présentant le gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ était le seul ST identifié dans la ferme 1 de Monastir et était absent dans toutes les autres fermes, tandis que ST8149 (n=3) portant le gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ et ST206 (n=5) portant le gène

bla$_{CTX-M-27}$ ont tous les deux été trouvés dans deux fermes à Monastir et à Sousse. L'analyse phylogénétique prouve l'expansion clonale de ces STs dans chaque ferme. La présence des ST8149 et ST206 chez des pigeons collectés dans des fermes situées à 18 km l'une de l'autre était plutôt inattendue, car ces oiseaux vivent généralement dans un petit périmètre, mais des vols sur de plus longues distances ont également été observés, en particulier pour la recherche de nourriture dans les champs. Jusqu'à présent, ST206 a été principalement associé à des hôtes animaux ; en particulier, et des isolats portant le gène *bla*$_{CTX-M-27}$ ont été identifiés dans de nombreux élevages de volailles au Nigeria ainsi que dans un isolat humain au Vietnam. De manière surprenante, des isolats de séquence type ST8149 porteurs de *bla*$_{CTX-M-15}$ ont déjà été signalés dans deux études différentes en Tunisie, l'une à partir d'un poisson (Sola et al., 2022a) et l'autre à partir d'un cafard (Landolsi et al., 2022). L'étude des supports génétiques a révélé que les gènes *bla*$_{CTX-M-27}$ dans les isolats de *E. coli* ST206 étaient localisés sur le chromosome dans un environnement génétique atypique. Cette localisation chromosomique a été fréquemment décrite, y compris dans les isolats Nigériens producteurs de *bla*$_{CTX-M-27}$ collectés dans des élevages de volailles. Cet isolat *E. coli* ST206 présentait un petit plasmide hybride IncX1/IncFIBk (48 kbp) portant de nombreux autres gènes de résistance (*tet*(A), *floR*, *sul3*, *dfrA1*, *aadA1*, *aph(6)-Id* et *aph(3")-Ib*). Cependant, le gène *bla*$_{CTX-M-15}$ était porté par un plasmide IncFIB/F- : A- : B53 dans les isolats d'*E. coli* ST5584 (#58954) et ST8149 (#61571) qui ont été collectés dans deux fermes différentes à Sousse et Monastir. Les plasmides hébergeaient conjointement les gènes *dfrA14*, *qnrS1*, *tet*(A) et [*sul2-aph(3")-Ib-aph(6)-Id]*, et p58954-CTX-M-15 (ST5584) présentait en plus le gène *bla*$_{TEM-1b}$. Ces deux plasmides partagent une grande similarité génétique. Une telle similitude pourrait suggérer un transfert horizontal d'un fond génétique à un autre. D'autre part, l'isolat ST29 de *K. pneumoniae* portait le gène *bla*$_{CTX-M-15}$ précédé de l'élément IS*Ecp1* sur un nouveau plasmide IncI1. Ce plasmide hébergeait également les gènes de résistance *aadA1*, *aadA2b*, *sul3* et *cmlA1* ; inversement, le gène *floR* était situé sur un plasmide IncX1 supplémentaire, tandis que les gènes intrinsèques restants *bla*$_{SHV-187}$, *fosA* et *oqxAB* étaient situés sur le chromosome. Finalement, les deux isolats de *P. putida* multirésistants portant à la fois la BLSE OXA-2 et la carbapénémase VIM-2 ont été identifiés dans une ferme à Sousse. Il s'agit de la deuxième occurrence d'un gène *bla*$_{VIM}$ chez les pigeons à ce jour, après sa description dans un isolat d'*E. coli* au Brésil. Dans notre étude, le gène *bla*$_{VIM-2}$

était situé sur un intégron de classe 1 portant également les gènes de résistance *sul1*, *qac*ΔE, *bla*$_{OXA-2}$, *qnrVC1* et *aadB*. De tels éléments génétiques mobiles ont déjà été décrits chez diverses espèces de *Pseudomonas* portant des gènes de carbapénémase (*bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{DIM}$) ainsi qu'une grande diversité d'autres gènes de résistance.

Conclusions

Nous rapportons dans cette étude pour la première fois la présence d'Enterobacterales productrices des BLSE de type CTX-M-15 et CTX-M-27, principalement chez *E. coli*, et de *P. putida* producteur de VIM-2 dans les fientes de pigeons en Tunisie. Notre étude suggère fortement que les transferts clonaux (ST8149 et ST5584) et plasmidiques (IncF/F-:A-:B53) ont joué un rôle dans la diffusion des gènes de résistance chez les pigeons. Cette étude a montré que les pigeons qui vivent en contact étroit avec les humains et les animaux, peuvent jouer un rôle de réservoirs et de vecteurs potentiels de bactéries multirésistantes à l'interface Homme-animal. Les recherches futures pourraient porter sur les facteurs influençant la dissémination de gènes résistants chez les pigeons et explorer leur impact potentiel sur la santé humaine.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un article qui a été soumis dans le journal « Journal of Global Antimicrobial Resistance » le 24 septembre 2023 sous la référence JGAR-S-23-00819.

2.2 Article

CTX-M-15/27-positive *Escherichia coli* and VIM-2-producing *Pseudomonas putida* in free-living pigeons (*Columba livia*) in Tunisia

Meriem Souguir[a,b], Pierre Châtre[b], Antoine Drapeau[b], Sana Azaiez[a], Imen Hmidi[a], Sana Ncir[a,b], Agnese Lupo[b], Jean-Yves Madec[b], Marisa Haenni[b#] and Wejdene Mansour[a]

[a] Université de Sousse, Faculté de Médecine Ibn Al Jazzar Sousse, Laboratoire de Recherche Biophysique Métabolique et Pharmacologie Appliquée, LR12ES02, Tunisie

[b]ANSES – Université de Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Lyon, France

Running title: resistant bacteria in Tunisian pigeons

(#) Corresponding author: marisa.haenni@anses.fr

Abstract

Objectives: Wild birds are vectors of antimicrobial resistance. Birds living in close contacts with humans or other animals, like feral pigeons (*Columba livia*), might be especially prone to acquire resistance genes such as those encoding extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and carbapenemases.

Methods: Cloacal samples (n=206) of free-living feral pigeons *(Columba livia)* were collected in Sousse and Monastir, Tunisia. Antimicrobial susceptibility profiles were determined by disc-diffusion, and resistant isolates were short- and long-read whole-genome sequenced. Sequence analysis was performed using tools of the center for genomic epidemiology (CGE), and phylogenetic analysis was performed based on the core-genome MLST.

Results: Ten (10/206, 4.9%) pigeons harbored CTX-M-15- and CTX-M-27-producing Enterobacterales, while two (1.0%) carried a VIM-2-producing *Pseudomonas putida*. Positive pigeons lived on four different livestock farms. Three STs (ST206, ST5584 and ST8149) were identified among *E. coli*, of which ST5584 and ST8149 were found in two different farms. Genetic diversity was also observed in *Enterobacter cloacae* and *P. putida* isolates. The $bla_{\text{CTX-M-27}}$ genes were located on the chromosome, while the $bla_{\text{CTX-M-15}}$ genes were carried on highly similar IncF/F-:A-:B53 plasmids. The $bla_{\text{VIM-2}}$ gene was located on a class 1 integron co-harboring several resistance genes.

Conclusion: here, pigeons living on livestock farms were carriers of clinically-important resistance genes encoding ESBLs and carbapenemases. Our results also evidenced that both clonal (ST8149 and ST5584) and plasmidic (IncF/F-:A-:B53) transfers played a role in the spread of resistance genes among pigeons. Further studies are needed to identify factors favouring the transfer and persistence of resistance genes within the pigeon communities.

Highlights

- 4.9% (10/206) of the pigeons carried an ESBL-producing *Enterobacterals* isolates.
- Two pigeons carried a VIM-2-producing *Pseudomonas putida* isolate.
- Plasmidic transmission of the IncF/F-:A-:B53 plasmid was observed.
- Clonal spread of the *E. coli* ST5584 and ST8149 was observed between two farms.

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) has become one of the most important global health issues in the 21st century, requiring multi-sectoral One Health approaches to understand the transmission dynamics of resistant bacteria and avoid the emergence of new pathogens. Wild birds have been identified as potential sentinels, reservoirs and vectors of AMR [1]. Synanthropic animals such as urban pigeons *(Columba livia)* are of interest to public health because of their proximity to humans and their interactions with livestock and wildlife [2]. Feral pigeons are among the most common bird species in urban and suburban areas, found in all continents except Antarctica. Pigeons have been reported to be an important reservoir of many pathogens, including bacteria such as *Salmonella* spp. or Shiga-toxin producing *E. coli*, which represents an important health hazard to humans [3, 4]. In addition, clinically-relevant resistant bacteria such as Enterobacterales producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) [2, 5, 6], carbapenemases (*bla*$_{VIM}$, *bla*$_{OXA-48}$) and colistin resistance genes have also been reported in these birds [7, 8]. *Acinetobacter* spp. resistant to carbapenems were also identified [9].

Urban pigeons are opportunistic and omnivorous, feeding mainly from food waste, sewage-contaminated environments, landfills, or areas contaminated with animal feces. This contributes to the possible horizontal transfer of resistant bacteria and resistance genes among pigeons, humans, animals, and their environment, making these birds potential sentinels of anthropogenic activities and indicators of the dissemination of AMR in the environment. Our main objective was to characterize Gram-negative bacteria resistant to extended-spectrum cephalosporins (ESC) and/or carbapenems isolated from the fecal samples of feral pigeons collected from two

Tunisian cities, in order to assess to which extent pigeons can act as potential indicators of environmental contamination.

2. Material and Methods

2.1. Birds sampling and bacterial isolation

Free-living feral pigeons *(Columba livia)* (n=206) were collected between April 2021 and May 2023 in Sousse and Monastir (22 km apart), Tunisia. Samples were obtained either using cloacal swabs when birds were captured (n=66), or by collecting fresh droppings when birds could not be captured (n=140). In Sousse, 178 pigeons were sampled, which were living either on four different livestock farms (farm 1 to 4; n=74), or in the city near the faculty and the university hospital (n=104) (Figure 1). In Monastir, 28 pigeons were collected from three livestock farms (farm 5 to 7). Feral pigeons living on farms were free to move in and out from the farms and were in close proximity to other animals.

Swabs were discharged into 5 ml Trypto-casein soy broth (TSB; Biokar), homogenized and incubated for 18-24 h at 37°C. Overnight cultures were inoculated on MacConkey agar plates supplemented with cefotaxime or imipenem (3 mg/L), for the detection of Gram-negative bacteria resistant to ESC or carbapenems, respectively. One colony per morphology and per plate was picked up. Identification was performed using API20E and API20NE galleries (bioMérieux).

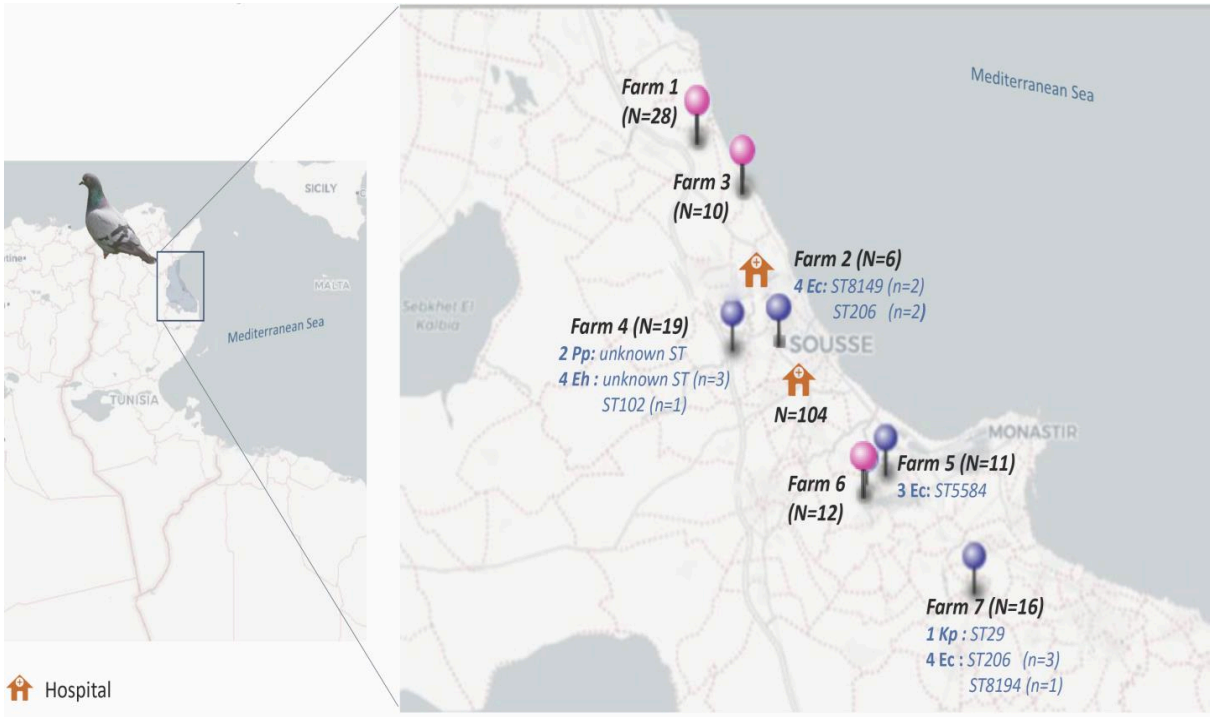


Figure 1. Geographical map showing the various locations of the farms where pigeons were sampled in Sousse and Monastir (Tunisia). Pink markers indicate farms where no resistant strains were isolated, while blue markers signify farms where resistant strains were found. The bacterial species present, which include *Klebsiella pneumoniae* (Kp), *Escherichia coli* (Ec), *Enterobacter hormaechei* (Eh) and *Pseudomonas putida* (Pp), and its respective numbers, as well as the number (n) of Sequence Types (STs) isolated in each respective species are also clearly noted. " N" corresponds to the number of sampled pigeons.

Figure 1. Geographical map showing the various locations of the farms where pigeons were sampled in Sousse and Monastir (Tunisia)

2.2. Antimicrobial Susceptibility Testing

Susceptibility testing was performed using the disc diffusion method on Mueller-Hinton agar, according to the guidelines and clinical breakpoints of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM; www.sfm-microbiologie.org). For Enterobacterales, 16 β-lactam (amoxicillin, piperacillin, ticarcillin, amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, cefalotin, cefuroxime, cefotaxime, ceftiofur, ceftazidime, cefoxitin, cefepime, cefquinome, aztreonam and ertapenem) and 14 non-β-lactam (tetracycline, kanamycin, tobramycin, gentamicin, amikacin, apramycin, netilmicin, streptomycin, florfenicol, chloramphenicol, sulfonamides, trimethoprim, nalidixic acid and enrofloxacin) antibiotics were tested, using *E. coli* ATCC 25922 strain as quality

control. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacterales were detected using the Double Disc Synergy Test (DDST). For *Pseudomonas* spp., the following antibiotics were tested using *P. aeruginosa* ATCC 27853 as quality control: piperacillin, ticarcillin, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, cefepim, ceftazidime, meropenem, imipenem, aztreonam, tobramycin, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, fosfomycin, and tigecycline. MICs to colistin were determined by broth microdilution according to the EUCAST recommendations.

2.3. Illumina short-read sequencing and data analyses

DNA was extracted using the NucleoSpin Microbial DNA extraction kit (Macherey-Nagel) and sequencing was performed on a NovaSeq 6000 instrument (Illumina). Reads were quality trimmed and *de novo* assembled using Shovill v1.0.4. The quality of assemblies was assessed using QUAST v5.0.2 (Table S1).

Identification was performed using Kraken (https://github.com/DerrickWood/kraken); sequence types (STs), resistance genes and virulence factors as well as the replicon content and the plasmid sub-typing were determined using the CGE online tools (http://www.genomicepidemiology.org/). Detection of the phylogenetic groups of each *E. coli* isolate was performed *in silico* using Clermontyping online tool (http://clermontyping.iame-research.center/). The genetic elements harboring the *bla*$_{VIM-2}$ gene was analyzed by blastn and Easyfig v.2.2.5 and compared to two similar elements found in the publically NCBI database (CP104583.1 and CP016446.1).

The cgMLST phylogeny was determined through the pyMLST pipeline (https://github.com/bvalot/pyMLST) using the scheme available on the www.cgmlst.org/ncs, which comprised 2513 alleles for *E. coli* (for allelic matrix, see Table S2). Cut-off for highly related strains was <10 allelic differences. The resulting tree was visualized using iTol v6 (http://itol.embl.de/itol.cgi).

2.4. MinION long-read sequencing

MinION long-read sequencing libraries were prepared according to the Oxford Nanopore Technologies using the native barcoding expansion kit (EXP-NBD104) and the ligation sequencing kit (SQK-LSK109). Sequencing was performed on a MinION sequencer using a SpotON Mk 1 R9 version flow cell (FLO-MIN106D). Assembly of both Illumina and Nanopore reads was performed using Unicycler. The assembled contigs were annotated using Bakta (Web version (Software: 1.8.1| DB: 5.0.0) (Schwengers et al., 2021).

2.5. Accession number

The project was deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under the BioProject accession number PRJNA1019937.

3. Results and Discussion

3.1 Prevalence of AmpC/ESBL producing isolates

Among the 206 pigeon samples tested, 14 (14/206, 6.8%) presented growth on plates containing cefotaxime, and two (2/206, 1.0%) on plates containing imipenem. All positive birds were living on four different farms (Figure 1). None of the birds sampled in the city and near a hospital presented resistant isolates, suggesting that contamination in these areas was not sufficient for resistant bacteria to be transmitted to the pigeons. Contrarily, farm environments, characterized by increased fecal contamination of the environment, more human-animal and animal-animal interactions and antibiotic usage in livestock, may offer favourable conditions for the transmission of resistance genes to birds.

One isolate was selected per bird, except for two samples presenting two colony morphologies, resulting in a final collection of 18 resistant isolates. The 16 cefotaxime-resistant isolates were Enterobacterales, including 11 *E. coli* and one *K.*

pneumoniae with an ESBL phenotype (12/206, 5.8%), and four *Enterobacter hormaechei* hyperproducing their intrinsic AmpC gene. The proportion of ESBL-producing *E. coli* observed in Tunisian pigeons was comparable to the one reported in international studies. Indeed, slightly lower rates were reported in France (1/71; 1.4%), Brazil (3/107; 2.8%) and Bangladesh (7/150; 4.7%) [2, 5, 10], while slightly higher rates were reported in Algeria (18/276; 6.5%) and Portugal (9%; 9/100) [6, 7]. These differences can be attributed to multiple factors, including protocols and methods, geographical variations, urbanization levels, and contamination of the environments.

The two imipenem-resistant isolates were *Pseudomonas putida*, which is a bacterial species rarely reported in pigeons.

3.2. Genetic diversity of resistant isolates and ESC/carbapenem-resistance genes

Three STs were identified among ESBL-*E. coli* isolates. ST5584 (n=3) presenting the *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gene was the unique ST identified in farm 1 in Monastir and was absent in all other farms, while ST8149 (n=3) carrying the *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gene and ST206 (n=5) carrying the *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ gene were both found in farm 2 in Sousse and in farm 6 in Monastir (Figure 1, Table S3). ST5584 isolates differed by 2-4 alleles, while ST206 and ST8149 respectively differed by 1-2 alleles, proving clonal expansion of these STs in each farm and highlighting that sharing a same habitat favours the spread of successful resistant clones. Whether the use of antibiotics to treat animals might plays a role in this spread of resistance in pigeons remains to be studied. The presence of ST8149 and ST206 in pigeons collected from farms located 18km apart was rather unexpected since these birds usually live in a small perimeter, but flights over longer distances were also observed especially for foraging in fields [11].

Another hypothesis might be that these resistant bacteria are carried by determinants shared between the two farms, such as care-takers, animals or food. The STs identified here were not pandemic but all have already been reported. ST206 has mainly been associated to animal hosts so far; in particular, one isolate carrying a *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gene has been identified in urban pigeons in Portugal [6], and isolates displaying the *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ gene were identified in numerous poultry flocks in Nigeria as well as in a human isolate in Vietnam [12]. Since genomic data from the two last studies were available, a cgMLST comparison was conducted (Figure 2, Table S3), which showed that isolates from Tunisian pigeons were genetically similar but not identical (28-37 allelic differences) to 33/35 poultry isolates from Nigeria, while they shared no genetic link with isolates from Vietnam (>600 allelic differences). Surprisingly, *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$-carrying ST8149 isolates have already been reported in two different studies in Tunisia, once from a fish and once from a cockroach [13, 14]. The fish isolate was similar but not identical to the pigeon isolates (21-22 allelic differences). ST5584 was more infrequent, sporadically reported as *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$-carrier in seawater in Ireland and in a Chinese patient [15, 16].

In farm 6, one *K. pneumoniae* ST29 carrying the *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gene was also isolated. ST29 has been recurrently reported from animal, water and human isolates carrying diverse resistance genes such as *bla*$_{\text{CTX-M}}$, *bla*$_{\text{NDM}}$ or *mcr-1*.

Finally, in farm 4, four *E. hormaechei* hyperproducing their intrinsic AmpC gene were identified, among which one isolate belonged to ST102 and the three other ones to two unknown STs (Table S3). In the same farm, two different carbapenem-resistant *P. putida* presenting the *bla*$_{\text{VIM-2}}$ genes were identified, which presented unknown STs with a non-identical allelic profile. A *bla*$_{\text{VIM}}$ gene has already been described in pigeons, but carried by an *E. coli* isolate and the gene variant was not determined [8].

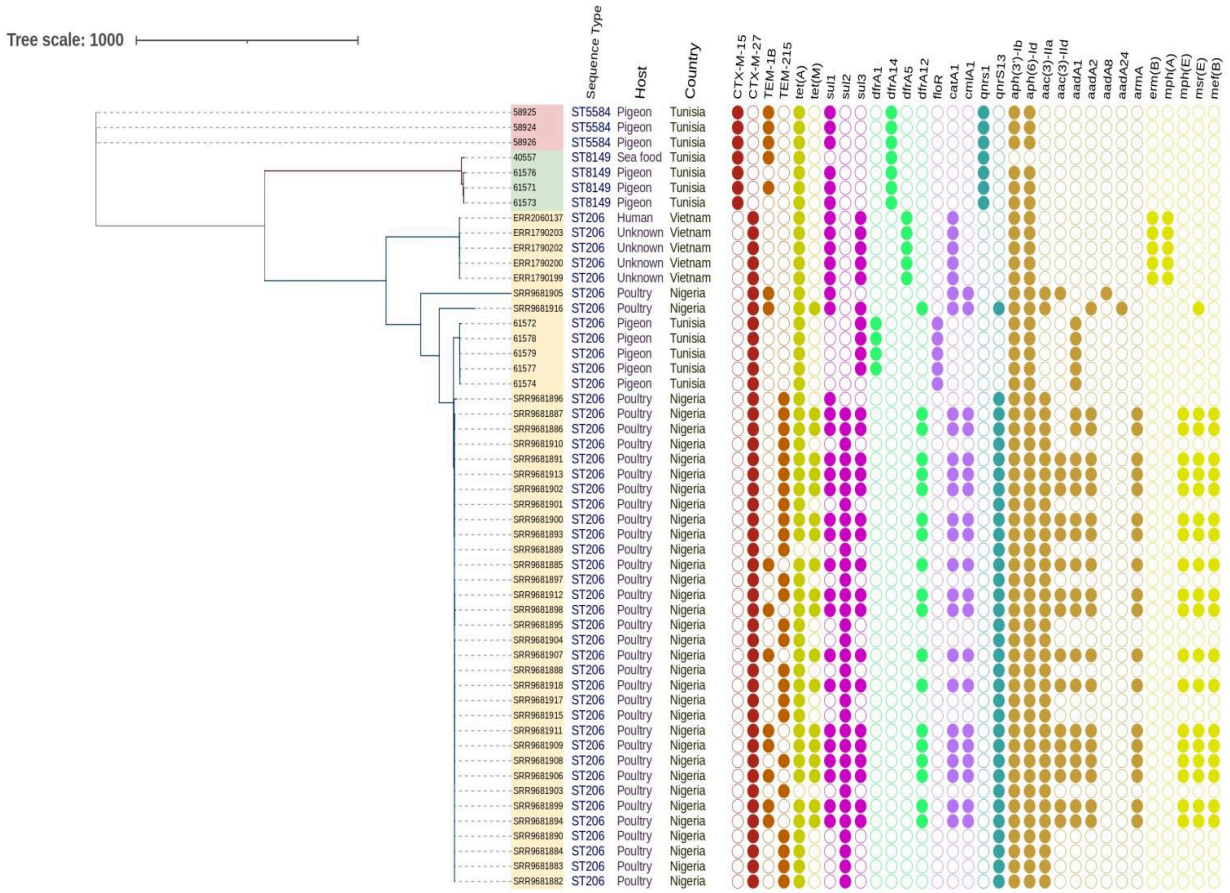


Figure 2. cgMLST-based phylogeny of *E. coli* isolates using iTOL. ST206 and ST1849 found in the publically available NCBI database were included for comparison.

3.3. Genetic determinants carrying resistance genes in CTX-M-positive *E. coli*

One representative of each ST was long-read sequenced to characterize the genetic elements carrying the resistance genes. The ST206 *E. coli* #61579 isolate presented an IncX1/IncFIBk small (48 kbp) hybrid plasmid carrying numerous resistance genes (*tet(A)*, *floR*, *sul3*, *dfrA1*, *aadA1*, *aph(6)-Id* and *aph(3")-Ib*) which conferred resistances to tetracyclines, chloramphenicol/florfenicol, sulfonamides-trimethoprim and streptomycin. Conversely, the *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ was located on the chromosome in an atypical genetic environment since it was not preceeded by an IS*26* but only followed by an IS*903B* family transposase. The chromosomal localization of *bla*$_{\text{CTX-M}}$ genes has been frequently described, including in the Nigerian *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$-producing isolates

collected from poultry [12], and is supposed to help stabilizing the resistance even in the absence of selective pressure.

The *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ gene was carried by an IncFIB/F-: A-: B53 plasmid (Figure 2A) in the *E. coli* ST5584 (#58954) and ST8149 (#61571) isolates that were collected from two different farms in Sousse and Monastir. Plasmids co-harbored the *dfrA14*, *qnrS1*, *tet(A)* and [*sul2-aph(3'')-Ib-aph(6)-Id*] genes, and p58954-CTX-M-15 (ST5584) additionally displayed the *bla*$_{TEM\text{-}1b}$. The two plasmids slightly differed by their size, p58954-CTX-M-15 being larger (84,588 bp) than p61571-CTX-M-15 (77,407 bp), but shared high similarity (99% nucleotide identity, 99% coverage). Such a similarity might suggest horizontal transfer from one genetic background to another, followed by differential evolution. This IncFIB/F-: A-: B53 plasmid might also be particularly successful since it has been reported in Tunisia in a fish isolate belonging to ST8149 [14], in humans, chicken and the environment in Madagascar [17] as well as in wild migratory birds in Pakistan [18]. Blastn search in the NCBI publically available database further revealed high similarity (99% identity, 99% coverage) with three *E. coli* plasmids originating from a soldier in West Mali in 2014 (p121_MLI106-1; CP116930.1), from raw milk cheese in Egypt in 2014 (pCFSAN061768; CP042974.1) and from wastewater effluent in Tokyo in 2017 (pWP7-S17-ESBL-04_1 DNA; AP022178.1).

3.4. Genetic determinants carrying resistance genes in the *K. pneumoniae* isolate

The ST29 *K. pneumoniae* isolate carried the *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ gene preceded by the IS*Ecp1* element on a 121,901 bp IncI1 plasmid whose pMLST profile was new (4/6*/1*/2/21*, where * indicates a novel allele) (Figure 3B). The plasmid additionally harboured the *aadA1*, *aadA2b*, *sul3* and *cmlA1* resistance genes; conversely, the *floR* gene was

located on an additional IncX1 plasmid while the remaining intrinsic genes *bla*$_{SHV-187}$, *fosA* and *oqxAB* were located on the chromosome. Comparison with publically available data showed that it only shared low similarity (99.99% identity, 72% coverage) with p90CM2-103k (CP071822.1), a *K. pneumoniae* plasmid found in healthy human's feces in Thailand in 2018 and sharing a similar pMLST type (4/6*/1*/2/9*).

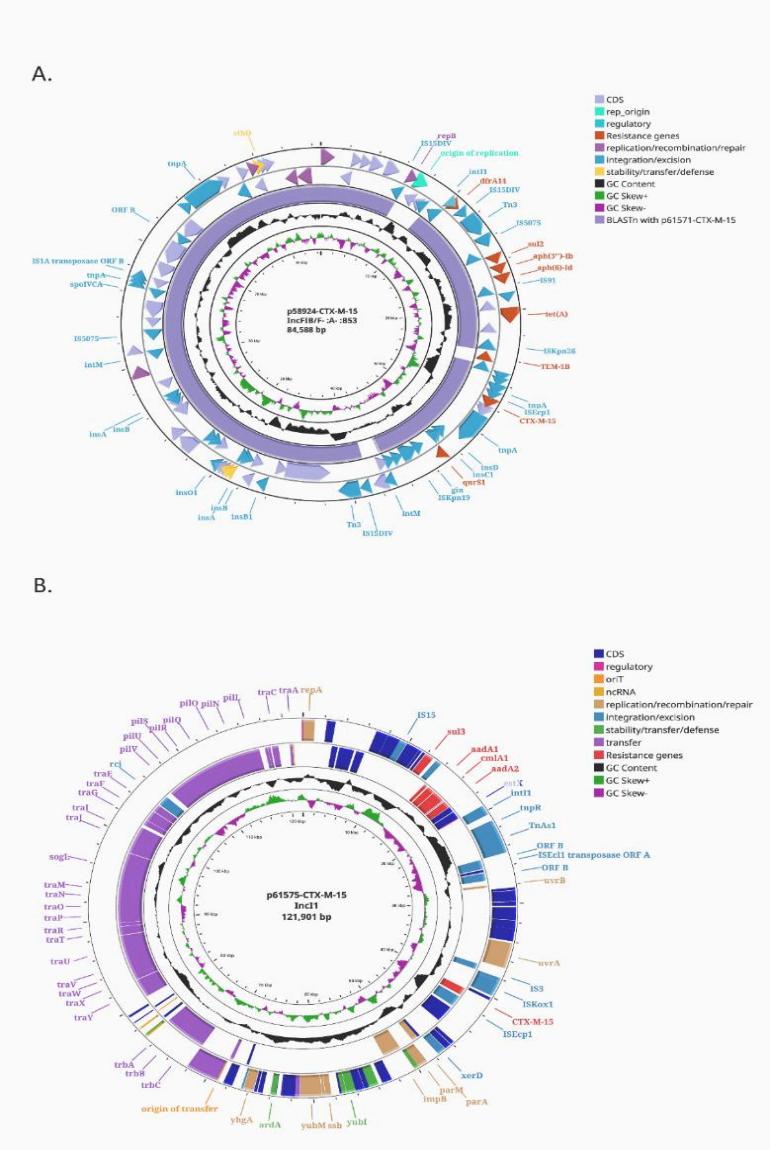


Figure 3. PROKSEE visualization of the long-read sequenced plasmids carrying the *bla*$_{CTX-M-15}$ genes: the two IncF/F-:A-:B53 plasmid carried by the *E. coli* #58924 and #61571 strains (A), and the IncI1 carried by the *K. pneumoniae* #61575 strain (B).

3.5. Genetic environment of the *bla*$_{VIM-2}$ gene in *P. putida*

Two multidrug-resistant *P. putida* isolates carrying both the ESBL *bla*$_{OXA-2}$ and carbapenemase *bla*$_{VIM-2}$ genes (Figure 3) were identified in a farm in Sousse. This is the second occurrence of a *bla*$_{VIM}$ gene in pigeons to date, after its description in an *E. coli* isolate in Brazil [8], and one of the few studies reporting carbapenemases in pigeon. In Marseille (France) and Annaba (Algeria), carbapenemase-encoding genes were detected in 16 out of 73 *Acinetobacter* spp. isolates, 13 being positive for the *bla*$_{OXA-58}$ gene and eight for the *bla*$_{OXA-23}$ genes [9]. Also in Algeria, in the city of Batna, 11 *E. coli* strains harbouring the *bla*$_{OXA-48}$ gene were found among the 276 droppings analysed [7]. The presence of OXA-48-producing *E. coli* has been recurrently reported in Batna, in hospital settings but also in humans in the community, in wastewater as well as in migratory storks [7]. This context probably created favourable conditions for the acquisition of this gene by pigeons contributing to OXA-48 endemicity, and its further spread in a given bacterial population is then assured by its localization on the highly successful IncL plasmids.

In our study, the *bla*$_{VIM-2}$ gene was located on a 13kbp class 1 integron also carrying the *sul1*, *qacΔE*, *bla*$_{OXA-2}$, *qnrVC1*, *aadB* resistance genes bracketed by genes encoding transposases of the Tn*3* family (Figure 4). The very same integron was identified in two *P. putida* from different STs, suggesting its transfer between birds and subsequently from one *P. putida* isolate to a different one. Such cassette arrays have already been described in diverse *Pseudomonas* species, carrying carbapenemase genes (*bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{DIM}$) as well as a high diversity of other resistance genes [19]. Cassette arrays presenting partial homologies with the integron described here were found in the publically available databases (Figure 3), but the overall genetic variability is very high. Such a genetic environment was

described in a *P. aeruginosa* from burn patients in Tunis in 2008 [20], but both the weak homology with the genetic structure of our isolates and the temporality rule out any possibility of genetic links between these isolates.

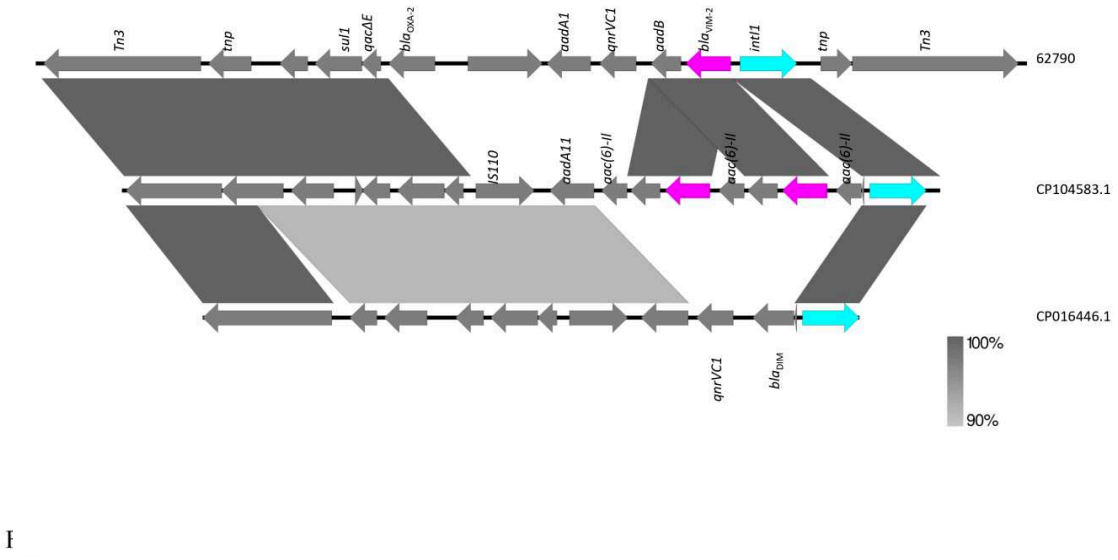


Figure 4. Easyfig v.2.2.5 representation of the blastn alignment of the *bla*VIM-2 element and similar elements found in *Pseudomonas* spp. CP104583.1 and *Pseudomonas putida* CP016446.1.

4. Conclusion

We report the presence of CTX-M-15 and CTX-M-27-producing Enterobacterales, mainly *E. coli*, and VIM-2 producing *P. putida* in pigeon droppings in Tunisia. Our study highlighted that both clonal (ST8149 and ST5584) and plasmidic (IncF/F-:A-:B53) transfers contributed to the spread of resistance genes among pigeons. Our results also corroborated that pigeons can be vectors of AMR, but specific conditions must be fulfilled to allow the colonization of acquired resistance. Indeed, no resistance genes were found in pigeons living in the city center, where humans-animals contacts and the proximity of hospitals seemed favourable conditions.

Further studies are needed to identify the factors influencing the dissemination and persistence of resistant genes within these avian communities, and to explore their potential impact on public health and ecosystems.

Funding

This work was funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES) and by the PHC-Utique/Campus France (AMR1Health, grant no. 46213QA).

Transparency declaration

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial interest.

References

[1] Bonnedahl J, Järhult JD. Antibiotic resistance in wild birds. Ups J Med Sci. 2014;119:113-6.

[2] Cunha MPV, Oliveira MCV, Oliveira MGX, Menão MC, Knöbl T. CTX-M-producing *Escherichia coli* Isolated from urban pigeons (*Columba livia domestica*) in Brazil. J Infect Dev Ctries. 2019;13:1052-6.

[3] de Oliveira MCV, Camargo BQ, Cunha MPV, Saidenberg AB, Teixeira RHF, Matajira CEC, et al. Free-ranging synanthropic birds (*Ardea alba* and *Columba livia domestica*) as carriers of *Salmonella* spp. and diarrheagenic *Escherichia coli* in the vicinity of an urban zoo. Vector Borne Zoonotic Dis. 2018;18:65-9.

[4] Haag-Wackernagel D, Moch H. Health hazards posed by feral pigeons. Journal of Infection. 2004;48:307-13.

[5] Ngaiganam EP, Pagnier I, Chaalal W, Leangapichart T, Chabou S, Rolain JM, et al. Investigation of urban birds as source of beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria in Marseille city, France. Acta Vet Scand. 2019;61:51.

[6] Freire S, Grilo T, Poirel L, Aires-de-Sousa M. Urban pigeons (*Columba livia*) as a source of broad-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Lisbon, Portugal. Antibiotics (Basel). 2022;11.

[7] Loucif L, Chelaghma W, Bendjama E, Cherak Z, Khellaf M, Khemri A, et al. Detection of *bla*$_{\text{OXA-48}}$ and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* isolates from pigeon (*Columba livia*) in Algeria. Microorganisms. 2022;10.

[8] Bueno TS, Loiko MR, Vidaletti MR, de Oliveira JA, Fetzner T, Cerva C, et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from free-living pigeons (*Columb*a *livia*): Insights into antibiotic environmental contamination and detection of resistance genes. Zoonoses and Public Health. 2022;69:682-93.

[9] Morakchi H, Loucif L, Gacemi-Kirane D, Rolain JM. Molecular characterisation of carbapenemases in urban pigeon droppings in France and Algeria. J Glob Antimicrob Resist. 2017;9:103-10.

[10] Hasan B, Islam K, Ahsan M, Hossain Z, Rashid M, Talukder B, et al. Fecal carriage of multi-drug resistant and extended spectrum β-lactamases producing *E. coli* in household pigeons, Bangladesh. Vet Microbiol. 2014;168:221-4.

[11] Rose E, Nagel P, Haag-Wackernagel D. Spatio-temporal use of the urban habitat by feral pigeons (Columba livia). Behavioral Ecology and Sociobiology. 2006;60:242-54.

[12] Ayeni FA, Falgenhauer J, Schmiedel J, Schwengers O, Chakraborty T, Falgenhauer L. Detection of *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$-encoding *Escherichia coli* ST206 in Nigerian poultry stocks. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2020;75:3070-2.

[13] Landolsi S, Selmi R, Hadjadj L, Ben Haj Yahia A, Ben Romdhane K, Messadi L, et al. First report of extended-spectrum β-lactamase *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ and colistin resistance gene *mcr-1* in *E. coli* of lineage ST648 from cockroaches in Tunisia. Microbiol Spectr. 2022;10:e0003621.

[14] Sola M, Mani Y, Saras E, Drapeau A, Grami R, Aouni M, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacterales from Tunisian seafood. Microorganisms. 2022;10:1364.

[15] Guiral E, Quiles MG, Muñoz L, Moreno-Morales J, Alejo-Cancho I, Salvador P, et al. Emergence of resistance to quinolones and beta-lactam antibiotics in enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* causing traveler's diarrhea. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2019;63:10.1128/aac.01745-18.

[16] Hooban B, Fitzhenry K, Cahill N, Joyce A, O' Connor L, Bray JE, et al. A point prevalence survey of antibiotic resistance in the Irish environment, 2018–2019. Environment International. 2021;152:106466.

[17] Milen M, Caroline P, Tiavina Lalaina R, Fetra Angelot R, Saida R, Lalaina Vonintsoa R, et al. Tricycle surveillance in Antananarivo, Madagascar: circulation of both extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* strains and plasmids among humans, chickens and the environment. medRxiv. 2023:2023.01.16.23284583.

[18] Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, Semmler T, et al. High prevalence of CTX-M-15-Type ESBL-producing *E. coli* from migratory avian species in Pakistan. Front Microbiol. 2017;8:2476.

[19] Di Pilato V, Antonelli A, Giani T, Henrici De Angelis L, Rossolini GM, Pollini S. Identification of a novel plasmid lineage associated with the dissemination of metallo-β-lactamase genes among *Pseudomonads*. Frontiers in Microbiology. 2019;10.

[20] Belotti PT, Thabet L, Laffargue A, André C, Coulange-Mayonnove L, Arpin C, et al. Description of an original integron encompassing *bla*$_{VIM-2}$, *qnrVC1* and genes encoding bacterial group II intron proteins in Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother. 2015;70:2237-40.

Tableau 4. Caractéristiques de toutes les souches isolées à partir des pigeons.

		Sampling informations				Genotyping				
Infobacter Ref	**Bird number**	**Date of sampling**	**Farm no.**	**City**	**Sample**	**Bacteria species**	**Sequence Type ST**	**Serotype**	**Phylo-group**	**Phenotype**
58924	4	18/04/2021	Farm 5	Monastir	Cloacal Swab	*Escherichia coli*	5584	O106/O17/O77/O73:H45	Clade I	BLSE
58925	6	18/04/2021	Farm 5	Monastir	Cloacal Swab	*Escherichia coli*	5584	O106/O17/O77/O73:H45	Clade I	BLSE
58926	9	18/04/2021	Farm 5	Monastir	Cloacal Swab	*Escherichia coli*	5584	O106/O17/O77/O73:H45	Clade I	BLSE
61571	55	12/05/2022	Farm 2	Sousse	Cloacal Swab	*Escherichia coli*	8149	O170:H4	A	BLSE
61572	56	22/05/2022	Farm 2	Sousse	Feces	*Escherichia coli*	206	ND:H5/H55	A	BLSE
61573	56	22/05/2022	Farm 2	Sousse	Feces	*Escherichia coli*	8149	O170:H4	A	BLSE
61574	57	22/05/2022	Farm 2	Sousse	Feces	*Escherichia coli*	206	ND:H5/H55	A	BLSE
61575	58	23/05/2022	Farm 6	Monastir	Feces	*Klebsiella pneumoniae*	29			BLSE
61576	59	23/05/2022	Farm 6	Monastir	Feces	*Escherichia coli*	8149	O170:H4	A	BLSE
61577	59	23/05/2022	Farm 6	Monastir	Feces	*Escherichia coli*	206	ND:H5/H55	A	BLSE
61578	60	23/05/2022	Farm 6	Monastir	Feces	*Escherichia coli*	206	ND:H5/H55	A	BLSE
61579	67	23/05/2022	Farm 6	Monastir	Feces	*Escherichia coli*	206	ND:H5/H55	A	BLSE
62766	84	02/03/2023	Farm 4	Sousse	Feces	*Enterobacter hormaechei*	ND (4/22/4/6/76/4*/115)			AmpC
62765	93	02/03/2023	Farm 4	Sousse	Feces	*Enterobacter hormaechei*	102 (59/9/12/9/67/6/25)			AmpC
62768	97	02/03/2023	Farm 4	Sousse	Feces	*Enterobacter hormaechei*	ND (59/9/12/9*/242/6/6)			AmpC
62767	94	02/03/2023	Farm 4	Sousse	Feces	*Enterobacter hormaechei*	ND (4/22/4/6/76/4*/115)			AmpC
62791	85	02/03/2023	Farm 4	Sousse	Feces	*Pseudomonas putida*	ND (51/62/14/59/141/75/3/142)			Carbapenemase
62790	98	02/03/2023	Farm 4	Sousse	Feces	*Pseudomonas putida*	ND (30*/142/161/71/49*/30/17/46)			Carbapenemase

Resistance genes											
Infobacter Ref	**ESBL gene**	**pAmpC gene**	**Penicillins**	**Tetracycline**	**Sulfonamides**	**Trimethoprim**	**Phenicols**	**Aminoglycosides**	**Quinolones**	**Fosfomycin**	**RND efflux pump**
58924	*bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{TEM-1B}$	tet(A)	sul2	dfrA14		aph(6)-Id, aph(3'')-Ib	qnrS1		
58925	*bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{TEM-1B}$	tet(A)	sul2	dfrA14		aph(6)-Id, aph(3'')-Ib	qnrS1		
58926	*bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{TEM-1B}$	tet(A)	sul2	dfrA14		aph(6)-Id, aph(3'')-Ib	qnrS1		
61571	*bla*$_{CTX-M-15}$			tet(A)	sul2	dfrA14		aph(6)-Id, aph(3'')-Ib	qnrS1		
61572	*bla*$_{CTX-M-27}$			tet(A)	sul3	dfrA1	floR	aadA1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib			
61573	*bla*$_{CTX-M-15}$			tet(A)	sul2	dfrA14		aph(6)-Id, aph(3'')-Ib	qnrS1		
61574	*bla*$_{CTX-M-27}$			tet(A)	sul3	dfrA1	floR	aadA1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib			
61575	*bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{SHV-187}$		sul3		floR, cmlA1	aadA1, aadA2b		fosA	OqxA, OqxB
61576	*bla*$_{CTX-M-15}$			tet(A)	sul2	dfrA14		aph(6)-Id, aph(3'')-Ib	qnrS1		
61577	*bla*$_{CTX-M-27}$			tet(A)	sul3	dfrA1	floR	aadA1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib			
61578	*bla*$_{CTX-M-27}$			tet(A)	sul3	dfrA1	floR	aadA1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib			
61579	*bla*$_{CTX-M-27}$			tet(A)	sul3	dfrA1	floR	aadA1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib			
62766		*bla*$_{ACT-7}$								fosA	
62765		*bla*$_{ACT-5}$								fosA	
62768		*bla*$_{ACT-14}$/ *bla*$_{ACT-5}$									
62767		*bla*$_{ACT-7}$								fosA	

Resistance genes											
Infobacter Ref	**ESBL gene**	**pAmpC gene**	**Penicillins**	**Tetracycline**	**Sulfonamides**	**Trimethoprim**	**Phenicols**	**Aminoglycosides**	**Quinolones**	**Fosfomycin**	**RND efflux pump**
62791	*bla*$_{VIM-2}$		*bla*$_{OXA-2}$	tmexD3, TOprJ3, tmexC3	sul1			ant(2'')-Ia, aadA1	qnrVC1		
62790	*bla*$_{VIM-2}$		*bla*$_{OXA-2}$	tmexD3, TOprJ3, tmexC3	sul1			aph(6)-Id. aph(3'')-Ib, ant(2'')-Ia, aadA1	qnrVC1		

NB : les cellules colorées en rose correspondent aux souches qui ont subi un séquençage long Read.

Tableau 5. Matrice des distances alléliques entre les isolats de *E. coli* collectés à partir des pigeons dans notre étude et ceux isolés à partir d'un produit de la mer en Tunisie.

ID	Farm	City/country	ST	ESBL gene	40557	58924	58925	58926	61571	61572	61573	61574	61576	61577	61578	61579
40557		Tunisia	8149	*bla*$_{CTX-M-15}$	0	2090	2091	2090	21	1735	22	1741	21	1741	1740	1742
58924	Farm 5	Monastir	5584	*bla*$_{CTX-M-15}$	2090	0	4	2	2088	2070	2090	2073	2083	2074	2074	2075
58925	Farm 5	Monastir	5584	*bla*$_{CTX-M-15}$	2091	4	0	3	2089	2071	2091	2074	2084	2075	2075	2076
58926	Farm 5	Monastir	5584	*bla*$_{CTX-M-15}$	2090	2	3	0	2088	2070	2090	2074	2083	2075	2074	2075
61571	Farm 2	Sousse	8149	*bla*$_{CTX-M-15}$	21	2088	2089	2088	0	1731	2	1737	1	1737	1736	1738
61572	Farm 2	Sousse	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	1735	2070	2071	2070	1731	0	1732	2	1728	1	1	2
61573	Farm 2	Sousse	8149	*bla*$_{CTX-M-15}$	22	2090	2091	2090	2	1732	0	1738	1	1738	1737	1739
61574	Farm 2	Sousse	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	1741	2073	2074	2074	1737	2	1738	0	1734	1	1	2
61576	Farm 6	Monastir	8149	*bla*$_{CTX-M-15}$	21	2083	2084	2083	1	1728	1	1734	0	1734	1733	1735
61577	Farm 6	Monastir	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	1741	2074	2075	2075	1737	1	1738	1	1734	0	0	1
61578	Farm 6	Monastir	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	1740	2074	2075	2074	1736	1	1737	1	1733	0	0	1
61579	Farm 6	Monastir	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	1742	2075	2076	2075	1738	2	1739	2	1735	1	1	0

Tableau 6. Matrice des distances alléliques entre les isolats d'E. coli ST206 porteurs du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}27}$ collectés dans cette étude et ceux isolés au Vietnam et au Nigéria.

ID	Farm	City/country	ST	ESBL gene	61572	61574	61577	61578	61579
61572	Farm 2	Sousse	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	0	2	1	1	2
61574	Farm 2	Sousse	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	2	0	1	1	2
61577	Farm 6	Monastir	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	1	1	0	0	1
61578	Farm 6	Monastir	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	1	1	0	0	1
61579	Farm 6	Monastir	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	2	2	1	1	0
ERR1790199		Vietnam	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	608	607	608	608	608
ERR1790200		Vietnam	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	608	607	608	608	608
ERR1790202		Vietnam	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	608	607	608	608	608
ERR1790203		Vietnam	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	608	607	608	608	608
ERR2060137		Vietnam	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	608	607	608	608	608
SRR9681882		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681883		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681884		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681885		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681886		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	29	30	29	29	30
SRR9681887		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	29	30	29	29	30
SRR9681888		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681889		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681890		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681891		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681893		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681894		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681895		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	28	29	28	28	29
SRR9681896		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	36	37	36	36	37
SRR9681897		Nigeria	206	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$	29	30	29	29	30

ID	Farm	City/country	ST	ESBL gene	61572	61574	61577	61578	61579
SRR9681898		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	31	32	31	31	32
SRR9681899		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681900		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681901		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681902		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681903		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681904		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	32	33	32	32	33
SRR9681905		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	107	107	107	107	108
SRR9681906		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681907		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	29	30	29	29	30
SRR9681908		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681909		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681910		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681911		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681912		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	29	30	29	29	30
SRR9681913		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681915		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681916		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	123	123	123	123	124
SRR9681917		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29
SRR9681918		Nigeria	206	*bla*$_{CTX-M-27}$	28	29	28	28	29

<10 allelic differences

<100 allelic differences

Tableau 7. Contrôles qualités du séquençage du génome entier de toutes les souches isolées et séquencées.

Infobacter N°	fastQC		Quast			Coverage (X)
	Total Sequences_ R1	Total Sequences_ R2	Total length	No. of contigs	N50	
58924	7002305	7002305	4938056	66	304060	428
58925	5726754	5726754	4937960	65	304041	350
58926	4612096	4612096	4938710	63	332385	282
61571	5438539	5438539	4633321	122	107825	354
61572	3796911	3796911	4704380	125	77133	244
61573	4297192	4297192	4631849	112	113821	280
61574	4534731	4534731	4785934	132	92484	286
61575	10503758	10503758	5761714	70	328898	551
61576	5000224	5000224	4580408	109	113821	330
61577	6646194	6646194	4755974	134	89087	422
61578	3779949	3779949	4799701	136	80327	238
61579	5072590	5072590	4798730	132	92483	319
62768	13324258	13324258	4628532	35	486742	869
62767	13212913	13212913	4752135	27	495433	840
62765	13079821	13079821	4725710	52	194855	836
62766	3764449	3764449	4751817	21	727389	239
62790	13756534	13756534	6372425	103	186487	652
62791	11380033	11380033	6296542	90	168414	546

IV. Discussion générale

L'antibiorésistance est un phénomène très complexe et étendu. Il ne se limite pas au contexte humain, et les bactéries résistantes ainsi que les gènes de résistance pertinents sur le plan clinique circulent activement dans le cadre de la triade animal-Homme-environnement. En effet, le phénomène de la résistance est devenu une préoccupation majeure et l'OMS l'a déclaré comme l'une des 10 principales menaces mondiales pour la santé publique auxquelles l'humanité est confrontée. Face à cette réalité, seule une politique mondiale basée sur une action coordonnée associant santé humaine, animale et environnement à travers le prisme One Heath peut appréhender ce problème. Ce concept a révélé des manques de connaissance dans la recherche sur l'antibiorésistance. En effet, pendant de nombreuses années, les travaux scientifiques se sont principalement concentrés sur l'Homme et les animaux d'élevage, en ignorant largement d'autres contextes. Au cours de la dernière décennie, les scientifiques se sont de plus en plus intéressés à la faune sauvage, en particulier aux oiseaux sauvages. Les données disponibles jusqu'à présent ont clairement montré que les oiseaux sauvages constituent un réservoir significatif de bactéries et de gènes de résistance aux antibiotiques, jouant ainsi un rôle potentiellement crucial dans la propagation mondiale de l'antibiorésistance. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse, qui a été consacré à l'étude approfondie de la résistance aux céphalosporines de dernières générations des bactéries isolées chez des oiseaux sauvages migrateurs (étourneaux sansonnet) et des oiseaux péri-domestiques (pigeons biset) capturés dans diverses villes en Tunisie. Notre objectif principal était d'évaluer le rôle potentiel de ces oiseaux en tant que réservoirs de bactéries résistantes aux antibiotiques et d'approfondir notre compréhension des voies de transmission possibles de ces résistances, afin d'ouvrir la voie à d'éventuelles études d'impact et d'évaluation du risque que ces oiseaux peuvent représenter dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques à l'Homme et les écosystèmes.

Nous avons choisi d'étudier deux espèces différentes d'oiseaux. Notre première étude s'est intéressée aux étourneaux, qui sont des oiseaux migrateurs, ce qui signifie qu'ils parcourent chaque année de longues distances lors de leur migration hivernale de l'Europe vers l'Afrique du Nord dont la Tunisie. Cette migration saisonnière les amène à traverser différentes régions géographiques, en franchissant les frontières nationales. Cette grande mobilité les expose à des environnements

divers et à des sources potentielles de bactéries résistantes aux antibiotiques. Par conséquent, les étourneaux peuvent jouer un rôle important dans la dispersion de ces bactéries sur de grandes distances. Pour notre seconde étude, nous avons choisi d'étudier les pigeons en raison de leur statut péri-domestique. Les pigeons vivent souvent à proximité des êtres humains, que ce soit en milieu urbain ou rural. Leur présence répandue en milieu urbain les amène à interagir avec les populations humaines et d'autres animaux domestiques et d'élevage, et même des animaux sauvages. Cette proximité crée des opportunités de transfert de bactéries entre les pigeons, les humains et d'autres animaux, favorisant potentiellement la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques dans ces populations.

Les études détaillées ci-dessus constituent les premières menées sur ces espèces d'oiseaux en Tunisie. En effet, cet axe de recherche est encore très limité en Tunisie puisque à ce jour seulement trois études ont été menées sur l'investigation de la résistance aux antibiotiques chez des espèces d'oiseaux sauvages, à savoir le héron garde-bœufs *(Bubulcus ibis)*, l'échasse blanche *(Himantopus himantopus),* le serin cini *(Serinus serinus)*, le verdier d'Europe *(Chloris chloris),* le goéland argenté (*Larus argentatus),* le chardonneret élégant *(Carduelis carduelis),* et la cigogne blanche *(Ciconia ciconia)*. En cohérence avec les autres études sur le sujet, les résultats de cette thèse ont démontré que les étourneaux et les pigeons constituent un réservoir important d'Enterobacterales produisant des BLSE et des pAmpC d'intérêt clinique majeur figurant sur la liste des priorités pathogènes élaborée par l'OMS. Cependant, les clones identifiés ne sont pour la plupart pas ceux qui sont majoritairement responsables de la dissémination des BLSE et AmpC chez l'Homme. Une des limitations de ces travaux de thèse, qui est le manque de prise en compte d'autres facteurs intrinsèques tels que l'âge, le sexe qui pourraient aussi influencer la composition du microbiote intestinal de ces populations de ces oiseaux (Smith et al., 2020; Sun et al., 2022; Waite and Taylor, 2014).

1. Etude des étourneaux en Tunisie

Dans la première étude menée sur les étourneaux, nous avons rapporté une proportion élevée d'*Escherichia spp.* résistants (21.5%), due à la présence d'enzymes de type BLSE (11.5%) et AmpC (11.0%). Ce travail rapporte pour la première fois la présence de ces gènes de résistance chez cette espèce d'oiseaux en Afrique. L'origine précise de ces gènes demeure inconnue et très difficile à tracer puisqu'il n'existe pas d'études semblables sur les étourneaux en d'autres endroits de leur trajet migratoire. Or, il est tout autant possible que ces gènes aient été acquis durant les migrations que pendant leur court séjour en Tunisie.

1.1 Résistances aux céphalosporines de dernières générations sur les trajets migratoires

En suivant les mouvements migratoires des étourneaux, on constate que leur migration hivernale depuis l'Europe vers l'Afrique du Nord se révèle être un voyage complexe (Figure 22). En effet, après leur séjour en Tunisie, ces oiseaux se dirigent principalement vers l'Italie. À leur arrivée en Italie, nous observons un rassemblement significatif d'étourneaux dans l'est du pays, notamment à Saint-Marin et à Ancône. Il est possible que ces zones jouent un rôle crucial en tant que points d'escale potentiels pour les étourneaux migrateurs, où ils pourraient interagir avec d'autres espèces d'oiseaux, la faune sauvage ou même les populations locales.

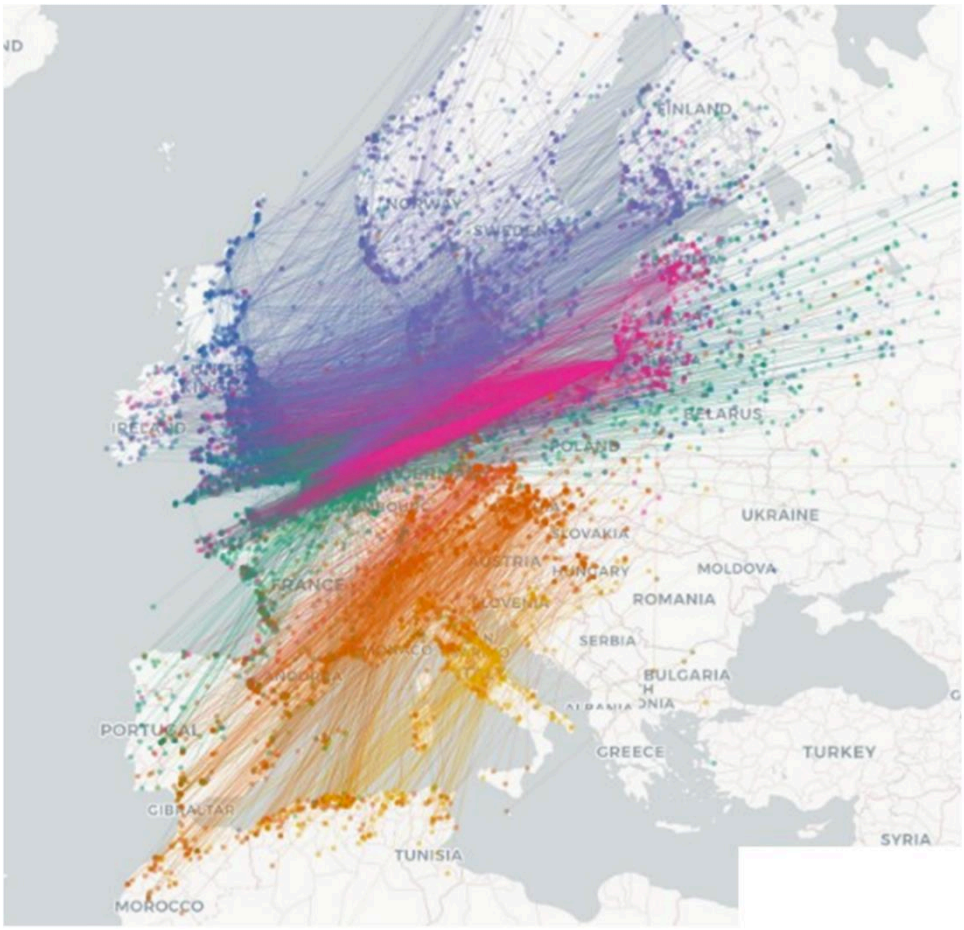


Figure 22. Carte montrant les mouvements migratoires des étourneaux

(The Eurasian African Bird Migration Atlas, 2022)

Après leur passage en Italie, les étourneaux continuent leur vol vers l'est, traversant plusieurs pays d'Europe, notamment la Croatie, la Hongrie, la Slovaquie, la Pologne, l'Autriche, la République tchèque, la Roumanie et la Biélorussie, pour finalement atteindre Moscou, en Russie. Ce voyage migratoire couvre d'immenses distances et expose ces oiseaux à une variété de milieux, d'habitats et de populations. Dans notre étude, nous avons identifié que les étourneaux sont porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques, tels que les BLSE (*bla*$_{\text{CTX-M-14}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ et *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$) et les céphalosporinases de type AmpC (*bla*$_{\text{CMY-2}}$), qui peuvent soit être portées initialement, soit être acquises au cours de leur migration à travers les pays de leur itinéraire. Nous n'avons pas pu déterminer l'origine de ces gènes de résistance, mais nous essayons de comprendre s'ils ont été acquis au cours de la traversée de ces

pays. Il est à noter que ces gènes ont également été détectés dans la plupart de ces pays chez d'autres espèces d'oiseaux sauvages.

La CTX-M-15 est l'enzyme la plus fréquemment signalée en Autriche, en Croatie, en République tchèque et en Pologne. Ces pays ainsi avec la Slovaquie signalent également la présence de CTX-M-1 dans de nombreuses espèces d'oiseaux tels que les canards colverts (*Anas platyrhynchos*), les goélands argentés, les mouettes rieuses et les oiseaux de mer (Palmeira et al., 2021a; Wang et al., 2017b). En ce qui concerne la CTX-M-14, il est intéressant de noter qu'elle a été récemment détectée en Russie (Sibérie) chez d'autres oiseaux migrateurs tels que le milan noir (*Milus migrans*) dans trois isolats de *E. coli* (1/ST23,2/ST93) (Tarabai et al., 2023) et dans des isolats de *E. coli* ST609 chez les goélands à ailes grises (*Larus glaucescens)* (Hernandez et al., 2010), ce qui suggère que la CTX-M-14 est plus fréquemment observée chez les oiseaux sauvages en Russie. Etant donné que l'enzyme CTX-M-14 était très prévalente dans notre étude on pourrait supposer qu'elle tire ses origines de Russie. La CTX-M-27, quant à elle, n'a été détectée qu'en République tchèque et en Slovaquie, principalement chez le grand Cormoran (*Phalacrocorax carbo*) dans des isolats de *E. coli* ST131 portés sur des plasmides FIA-FIB (Tausova et al., 2012) et également dans un seul isolat de *E. coli* ST12671 issu du milan noir en Russie (Tarabai et al., 2023). La CMY-2 quant à elle a été signalée en République tchèque dans des goélands, où elle était portée par le plasmide IncX1 (Dobiasova and Dolejska, 2016) et dans des corbeaux freux (*Corvus frugilegus*) en Pologne, portée par une grande diversité de STs (Jamborova et al., 2015), ainsi qu'en Autriche dans des isolats de *E. coli* ST224 (Loncaric et al., 2013). La CMY-2 a aussi été détectée dans des milans noir en Russie avec une diversité de STs y compris le clone ST162 qui a été également détecté chez les étourneaux dans la présente étude (Tarabai et al., 2023). Cette enzyme pourrait donc aussi tirer ses origines des pays slaves de l'est de l'Europe. Cependant, la dissémination ne s'est pas faite de manière directe et linéaire, puisqu'aucun des deux plasmides portant ces résistances dans notre étude (IncHI2/pST3 et IncI1 non typbale) n'ont été identifiés dans ces pays. Par ailleurs, nous avons noté qu'une minorité de populations d'étourneaux qui partent de Bizerte suivent un autre itinéraire vers le Nord en traversant la Sardaigne, l'Italie, la Suisse et finalement l'Allemagne. L'Allemagne a signalé la présence de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment la *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ portée par un *E. coli*

ST648 chez diverses espèces d'oiseaux sauvages tels que le merle noir (*Turdus merula*), le pigeon biset (*Columba livia*) et l'oie à front blanc (*Anser albifrons*) (Guenther et al., 2010). Les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ ont également été détectés chez des oiseaux comme le milan noir (*Milvus migrans*), le milan royal (*Milvus milvus*) et la buse variable (*Buteo buteo*) (Guenther et al., 2012) (Plaza-Rodríguez et al., 2021), avec une prévalence toujours plus élevée de l'enzyme CTX-M-1. Pour la Suisse, le gène *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ a été détecté dans deux isolats de *E. coli* ST540 et ST205 issus de corbeaux freux et pic épeiche (*Dendrocopos major*), respectivement, alors que le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ a été signalé dans un isolat de *E. coli* (ST1722) chez un héron cendré (*Ardea cinerea*) (Zurfluh et al., 2019). Cependant, il n'existe actuellement aucune donnée concernant ces gènes de résistance chez les oiseaux sauvages en Italie. La plupart de ces espèces d'oiseaux, notamment les goélands, les grands cormorans et les milans noirs, sont également des oiseaux migrateurs qui transitent par la Tunisie. Ils empruntent des routes migratoires qui se croisent avec celles des étourneaux, ce qui suggère la possibilité d'interactions entre ces populations. Ces interactions pourraient accroître les risques de transmission de gènes et de bactéries résistantes. Par exemple, le milan noir se trouve principalement dans la partie nord de la Tunisie. Il traverse la Méditerranée en direction de l'Europe du Nord, en passant par l'Italie, la Suisse et l'Allemagne. Il voyage également vers l'ouest et arrive en Ukraine après avoir traversé les mêmes pays que ceux parcourus par les étourneaux. Cependant, il existe une autre population qui migre du Moyen-Orient (Liban, Syrie et Jordanie) vers la Russie. En ce qui concerne le grand cormoran, cette population d'oiseaux migre principalement vers le nord et l'est de la Tunisie, arrivant jusqu'au sud et au golfe de Gabès. Ces oiseaux proviennent principalement du nord (Norvège, Finlande et Suède), passent par l'Europe centrale et voyagent à travers les mêmes pays que les étourneaux.

Les études citées suggèrent des hypothèses sur l'origine potentielle des souches isolées chez les étourneaux remontant jusqu'à la Russie, mais ne permettent en aucun cas de retracer des voies de transmissions claires. Seules des études plus approfondies sur ces routes migratoires pourront reconstruire le trajet géographique et évolutif de ces souches résistantes.

1.2 Identification de *E. marmotae*, une bactérie originaire de la faune sauvage ?

Une découverte surprenante émanant de cette étude est la proportion élevée d'isolats d'*E. marmotae,* qui appartenaient presque tous au ST133, signant donc une diffusion clonale chez les étourneaux. L'espèce *E. marmotae*, phénotypiquement indiscernable d'*E. coli* et précédemment appelée *E. coli* de clade cryptique V, a été récemment assignée suite à son isolement chez les marmottes sauvages en Chine (Liu et al., 2019). Les souches du clade V sont les plus divergentes parmi tous les clades d'*E. coli*. Ce clade a été fréquemment identifié en France et en Australie, principalement chez les oiseaux et les mammifères. Cette observation suggère que les clades cryptiques peuvent occuper des niches écologiques distinctes de celles préférentiellement colonisées par la plupart des souches d'*E. coli* (Clermont et al., 2011). Liu *et al.*, lors de leur découverte de ces souches chez les marmottes sauvages, ont émis l'hypothèse que les animaux sauvages pourraient constituer des réservoirs naturels d'*E. marmotae*. En effet, cette espèce bactérienne a également été identifiée chez d'autres animaux sauvages, suggérant que la faune sauvage pourrait être son hôte principal. En effet, un isolat de *E. marmotae* (de ST inconnue) portant le gène *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ a été détecté chez une marmotte alpine (*Marmota marmotae*) dans un zoo belge (De Witte et al., 2021), et le gène *bla*$_{\text{CTX-M-32}}$ a été signalé dans un isolat d'*E. marmotae* provenant de viande de gibier sauvage en Europe centrale (Nüesch-Inderbinen et al., 2022). En outre, la banque de données publiques du NCBI (GenBank) contient des informations sur trois souches d'*E. marmotae* isolées du diaphragme de sangliers. Récemment, *E. marmotae* a été décrite au bord du fleuve de Volka en Russie chez les campagnols roussâtres (*Myodes glareolus*), une autre espèce de rongeurs sauvages (Zhurilov et al., 2023). Cependant, il est également démontré que les animaux d'élevage peuvent être porteurs de cette bactérie. En 2020, *E. marmotae* a été isolée à partir de matières fécales de vaches dans le nord de l'Espagne (Ocejo et al., 2020), et en 2021 *E. marmotae* a été isolée à partir d'échantillons fécaux frais de poules saines d'élevage au Royaume-Uni (Thomson et al., 2022). En outre, *E. marmotae* a été isolée chez des animaux de compagnie. GenBank contient des assemblages de génomes d'*E. marmotae* isolées du conduit auditif externe de canidés et du canal mammaire d'une femelle de canidés (*Canis lupus familiaris*) en Australie. Il est également à noter que

l'environnement aquatique peut constituer une source d'*E. marmotae*. GenBank recense en effet des isolats d'*E. marmotae* provenant d'échantillons d'eau douce en aval d'usines de traitement des eaux usées au Royaume-Uni, ainsi que des cas d'isolement à partir de la ligne de flottaison aux États-Unis.

Sur le plan clinique, *E. marmotae* a été trouvé pour la première fois en Norvège en 2022 comme responsable d'infections invasives chez l'Homme. Audun Sivertsen *et al.* ont étudié quatre cas d'infection où *E. marmotae* a provoqué une septicémie inconnue, une septicémie chirurgicale et une infection des voies urinaires supérieures. Tous les cas d'infection ont été considérés comme tirant leur origine de la communauté. L'étude phylogénétique des isolats a révélé une pathogénicité inhérente à de nombreuses lignées d'*E. marmotae*, y compris des souches non humaines. *E. marmotae* possède également un grand génome auxiliaire, ce qui témoigne de son adaptabilité écologique (Sivertsen et al., 2022).

En ce qui concerne les oiseaux sauvages, deux isolats de *E. marmotae* ont été identifiés à partir des corbeaux urbains au Japon, ces souches étaient ExECP formant un cluster avec des souches humaines associées à la septicémie. Mais ces souches ne portaient pas de gènes de résistance (Sakaguchi et al., 2023). Notre étude constitue donc la première détection d'*E. marmotae* multirésistants hébergeant les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ et *bla*$_{\text{CMY-2}}$ isolée à partir d'étourneaux sauvages.

Dans notre étude, nous avons observé la présence concomitante dans les populations d'étourneaux de *E. coli et E. marmotae* portant les mêmes gènes de résistance, à savoir *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ et *bla*$_{\text{CMY-2}}$. Les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ étaient tous portés par un plasmide de type IncHI2/pST3, qu'ils aient été identifiés chez *E. coli ou E. marmotae*. Par conséquent, ces résultats montrent que ces plasmides porteurs de résistance peuvent être échangés entre ces deux espèces. Cela a été clairement démontré dans notre étude à partir des exemples de *E. marmotae* et *E. coli* colonisant la même niche (microbiote intestinal des étourneaux). Cela est encore plus préoccupant lorsque ces animaux hôtes sont des oiseaux migrateurs qui peuvent disperser la résistance dans divers environnements, diverses espèces animales ainsi que dans plusieurs pays et sur plusieurs continents. Par ailleurs, dans notre cas, les étourneaux sont capturés et utilisés comme source de nourriture, ce qui pourrait amplifier le risque de la transmission de ces bactéries résistantes à

travers la chaine alimentaire. Le second déterminant génétique partagé entre *E. coli* et *E. marmotae* était les plasmides IncI1/*bla*$_{CMY-2}$, qui n'ont été identifiés qu'à Zaghouan. Ces plasmides ne portaient que le gène *bla*$_{CMY-2}$, sans autre gène de résistance. Ils sont non typables car dépourvus du gène *repI1* dans les isolats de *E. coli*, tandis que ceux d'*E. marmotae* présentaient un gène *repI1* inconnu. Il est intéressant de noter que les plasmides présentant les types de pMLST les plus proches provenaient tous d'humains ou de porcs à Taïwan, à l'exception de deux provenant d'un chien au Royaume-Uni. D'autres déterminants sporadiques tels que les gènes *bla*$_{CTX-M-27}$/IncF/F2:A-:B10, *bla*$_{CTX-M-1}$/IncHI2/ST4 et les gènes *bla*$_{CTX-M-15}$ codés sur le chromosome, qui n'ont pas été détectés que chez les isolats de *E. coli*. La structure génétique de ces plasmides était remarquablement similaire à celle d'autres plasmides détectés dans des isolats cliniques (comme décrits dans l'article). Cette similitude souligne la capacité potentielle de ces oiseaux à propager ces plasmides à travers divers écosystèmes.

En plus du gène de résistance *bla*$_{CTX-M-14,}$ les plasmides IncHI2/pST3 portés par *E. marmotae* et l'un de ceux portés par *E. coli* co-hébergaient le gène *fosA3* conférant la résistance à la fosfomycine. Cela suscite des inquiétudes car la fosfomycine est l'un des derniers antibiotiques efficaces contre les BGN productrices de carbapénémases. La première description de *fos*A3 localisé sur des plasmides IncHI2 a été rapportée en Chine dans des isolats de poulet, lorsqu'un plasmide IncHI2/ST3 épidémique a entraîné la dissémination de *fos*A3 avec les autres gènes de résistance *bla*$_{CTXM-14}$, *bla*$_{CXT-M-15}$ et *bla*$_{CTX-M-65}$ dans différentes régions géographiques de la Chine (Yang et al., 2014). En outre, une étude menée en Allemagne a fait état de la détection de *fos*A3 avec *bla*$_{CTX-M-14}$ sur un plasmide conjugatif IncHI2 provenant de légumes frais (Freitag et al., 2018). Les plasmides porteurs de *fosA3* circulent parmi les humains, les animaux et l'environnement (Zurfluh et al., 2020), mais seules deux études ont signalé la présence de *fosA3* chez des oiseaux sauvages. La première a signalé la présence de *fosA3* sur un plasmide IncA/C dans une souche de *Salmonella enterica* serovar Corvallis isolée d'un oiseau sauvage (*Milvus migrans*) en Allemagne (Villa et al., 2015) représentant la première détection de gène *fosA3* en Europe. Plus récemment, *fos*A3 a été isolé à partir d'une souche d'*E. coli* (ST11350) chez un oiseau de mer sauvage (*Fregata magnificens*) dans l'océan Atlantique sud, au Brésil (Ewbank et al., 2022a). La

propagation conjointe de *fosA3* avec d'autres gènes importants de résistance aux antibiotiques est une source de préoccupation en raison du potentiel de développement rapide de souches BMR comme dans la présente étude. Ces observations soulignent le danger réel que ces oiseaux migrateurs pourraient représenter, car elle soulève la possibilité que ces bactéries entrent dans la chaîne alimentaire et affectent la santé humaine.

1.3 Résistance chez les étourneaux : des origines multiples et mélangées

Les résultats de cette étude ont révélé que les étourneaux constituent un réservoir important des bactéries résistantes non-humaines à savoir *E. marmotae* ST133. Cette souche pourrait avoir une origine dans la faune sauvage, comme cela a été démontré dans d'autres études antérieures. En revanche, la détection des plasmides IncHI2, qui se propagent dans l'environnement, suggère un transfert horizontal de gènes de résistance entre les bactéries environnementales et cette espèce en particulier.

Néanmoins, nous avons isolé trois clones pandémiques au sein des isolats d'*E. coli*, à savoir ST38, ST155 et ST162, mais il ne s'agit pas des clones majoritaires. Ces clones présentent un risque élevé et ont été associés à des épidémies à l'échelle mondiale, tant dans les milieux hospitaliers que communautaires. Ces constatations soulignent la circulation de ces groupes de clones à l'interface entre les populations humaines et l'environnement. En effet, il est évident que la contamination de ces oiseaux provient d'un environnement contaminé par ces bactéries et ces gènes de résistance, car les oiseaux ne sont pas directement exposés aux composés antibiotiques, mais plutôt aux agents pathogènes issus d'un environnement de plus en plus pollué. En réalité, l'environnement s'est transformé en un gigantesque réservoir de bactéries et de gènes de résistance, se développant en réponse à une pollution constante et grandissante. Les oiseaux occupent donc une place importante dans le scénario d'émergence de la RAM grâce à leurs mouvements migratoires qui dispersent continuellement les bactéries résistantes et les gènes associés dans les différents écosystèmes.

Les conclusions de notre étude ont révélé que les étourneaux sansonnets représentent un réservoir non négligeable d'Enterobacterales présentant des BLSE et AmpC portés par des plasmides multirésistants à caractère pandémique. Nous

avons aussi mis en évidence le rôle crucial de *E. marmotae* et plus particulièrement sa lignée ST133 dans la dissémination des gènes CTX-M-14 par le biais de plasmide IncHI2/pST3 au sein du microbiote intestinal des étourneaux. Ces oiseaux, en raison de leur potentiel migratoire considérable, franchissant plusieurs frontières internationales et croisant la route d'autres espèces, pourraient bien être des vecteurs de la RAM sur leurs trajets migratoires.

2. Etude des pigeons dans la région de Sousse et Monastir

La seconde étude menée dans le cadre de cette thèse visait à évaluer le fardeau de la RAM chez les pigeons sauvages. Ce choix a été motivé par le caractère péri-domestique et non migratoire de ces oiseaux, qui les différenciait clairement des étourneaux. En effet, les pigeons vivent à proximité des êtres humains, sont omniprésents et peuvent être observés dans divers environnements tels que les zones urbaines, les zones agricoles, les espaces proches des animaux d'élevage, des animaux domestiques et même à proximité d'autres oiseaux sauvages.

Les résultats de notre recherche ont mis en évidence que les pigeons constituent un réservoir important de bactéries à Gram négatif portant des gènes de résistance aux céphalosporinases (BLSE et AmpC), ainsi que des carbapénémases qui présentent un intérêt clinique majeur. Des BLSE de type CTX-M-15 ont été isolées chez *E. coli* principalement, et dans une moindre mesure chez *K. pneumoniae*, tandis que l'enzyme CTX-M-27 a été identifiée dans des isolats de *E. coli* ST206. De plus, les gènes *ampC* de type *bla*$_{\text{ACT-7}}$ et *bla*$_{\text{ACT-5}}$ ont été identifiés chez des isolats de *E. hormaechei* hyperproduisant leur gène *ampC* chromosomique. Nous avons également identifié deux souches de *P. putida* présentant un phénotype de BMR en raison de la coproduction d'une bêta-lactamase OXA-2 et d'une MBL VIM-2.

Les isolats positifs proviennent tous de pigeons échantillonnés dans des élevages d'animaux de rente (notamment bovins, moutons et volailles) situés dans deux villes distinctes. En revanche, les pigeons vivant en milieu urbain à proximité d'un hôpital se sont tous révélés négatifs. Ces constatations mettent en évidence l'influence de l'environnement sur l'acquisition des souches résistantes chez ces oiseaux. D'autres études ont démontré que la diversité des communautés microbiennes intestinales était significativement réduite lorsque les oiseaux étaient nourris avec des aliments

urbains par rapport aux individus nourris avec des aliments ruraux (Teyssier et al., 2020). Il semble également que les pigeons vivant à proximité d'animaux d'élevage soumis à des traitements antibiotiques soient particulièrement aptes à acquérir et maintenir des résistances du type BLSE dans leur microbiote, possiblement en raison de la présence de résidus d'antibiotiques dans leur environnement. Cette dernière hypothèse reste cependant à tester. De plus, ces résultats soulignent la possibilité de transmission de gènes de résistance entre les populations d'oiseaux sauvages et les animaux d'élevage. Le risque associé à ces constatations est aggravé par la mobilité de ces oiseaux. Ils sont en mesure de quitter les fermes pour se rendre dans les villes et les zones urbaines, ce qui leur permet de disséminer les gènes de résistance à travers différents types d'environnements.

Nous avons identifié trois séquences types dans les isolats de *E. coli* : ST5584, ST8149 et ST206. Ces STs sont fréquemment isolées dans des isolats cliniques animaux et environnementaux selon la base des données Enterobase dernier accès le (30/09/2023) https://enterobase.warwick.ac.uk/ mais sont rares en clinique humaine.

E. coli ST5584, portant le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15,}}$ a été isolée dans trois isolats dans une seule ferme avec une expansion clonale, tandis que ST8149 (n=3) portant le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ et ST206 (n=5) portant le gène *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ ont tous deux été trouvés dans deux fermes différentes dans deux villes séparées par une distance de plus de 18Km. Cette présence inattendue de deux clones identiques dans deux fermes éloignées pourrait être expliquée par le fait que les pigeons peuvent effectuer des vols plus longs à la recherche de nourriture, surtout vers les champs agricoles où ils peuvent disséminer la résistance. De manière significative, la lignée ST8149 a également été identifiée dans une souche d'*E. coli* isolée à partir du microbiote intestinal d'un cafard piégé dans une restauration collective en Tunisie (Landolsi et al., 2022). Cette lignée a été également isolée à partir du produit de la mer en Tunisie (Sola et al., 2022b). Cette constatation suggère que ce clone spécifique se propage entre différents environnements en Tunisie. *E. coli* ST206 présentant le gène *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ a été identifiée dans de nombreux élevages de volailles au Nigeria ainsi que dans un isolat humain au Vietnam et ont été génétiquement liés à nos isolats de pigeons (Ayeni et al., 2020). Ce clone a également été identifié dans des isolats de *E. coli* portant le gène *mcr-1* dans des élevages de porcs en Chine (Lee et

al., 2022) et dans des isolats de *E. coli* produisant la CTX-M-14 dans des produits de mer (coquillages) au Portugal (Freire et al., 2023).

Une analyse moléculaire détaillée des déterminants génétiques portant ces gènes a révélé que le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, présent dans les isolats de *E. coli* appartenant aux séquences types ST5584 et ST8149, est localisé sur des plasmides de type IncF/F- : A-:B53. Ces plasmides présentent également plusieurs autres gènes de résistance, notamment *aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, qnrS1, bla*$_{\text{TEM-1B}}$*, tet(A) et dfrA14*. Un point intéressant à noter est que le plasmide IncF/F- : A- : B53 pourrait également être particulièrement répandu puisqu'il a été signalé en Tunisie dans un isolat de poisson appartenant également au clone ST8149 et portant ainsi le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{TEM-1B}}$, *tetA, dfrA14, qnrS1 et mdfA*. La structure génétique de ce plasmide présentait une grande similitude avec celle détectée dans diverses sources, qu'il s'agisse d'animaux, d'êtres humains ou d'environnements. Cette observation suggère que ces plasmides résistants sont largement répandus et se propagent entre différentes populations. Il est important de noter que cette étude est la première concernant les pigeons en Tunisie, mettant en évidence la détection de ces gènes de résistance chez ces oiseaux.

En outre, nous avons identifié la présence de VIM-2 chez les isolats de *P. putida*, marquant ainsi sa première détection en Afrique. Cette enzyme de type MBL est ainsi détectée pour la deuxième fois à l'échelle mondiale chez les pigeons urbains, après sa première détection dans un isolat d'*E. coli* au Brésil (Bueno et al., 2022c). VIM-2 était localisé sur un intégron de classe 1 portant d'autres gènes de résistance tels que *sul1, qac*Δ*E, bla*$_{\text{OXA-2}}$*, qnrVC1 et aadB,* flanqués par des gènes codant pour des transposases de la famille Tn*3*. Le même intégron a été identifié dans deux souches de *P. putida* appartenant à des STs différentes, ce qui suggère son transfert entre oiseaux d'un isolat de *P. putida* à un autre. De tels réseaux de cassettes ont déjà été décrits chez diverses espèces de *Pseudomonas*, portant des gènes codants pour des MBL. La structure génétique de l'intégron portant le gène *bla*$_{\text{VIM-2}}$ décrite dans notre étude est très similaire à celle identifiée dans des souches de *P. aeruginosa* isolées chez des patients brulés dans un hôpital de Tunis. Ce gène est fréquemment décrit dans des intégrons de classe 1 en Tunisie (Dziri et al., 2020).

La première détection du gène *bla*$_{VIM-2}$ en Tunisie était en 2009 dans des isolats cliniques de *P. aeruginosa* dans l'hôpital de Sahloul à Sousse (Mansour et al., 2009) et depuis lors ce gène a émergé chez les isolats de *P. aeruginosa* en Tunisie causant des épidémies hospitalières dans tout le pays (Hammami et al., 2010). Ce gène a été également trouvé chez des souches de *E. coli* et *K. pneumoniae* dans des environnements hospitaliers (Maaroufi et al., 2021), mais ce variant n'a pas encore été détecté dans l'environnement hydrique ou chez les animaux d'élevage (Dziri et al., 2020).

La détection d'une MBL chez les pigeons sauvages en milieu urbain suscite une préoccupation majeure, car ces enzymes confèrent une résistance aux carbapénèmes, qui sont les antibiotiques de dernier recours pour le traitement des infections bactériennes graves. La présence de cette enzyme épidémique dans le pays chez ces oiseaux souligne le risque substantiel que les pigeons pourraient contribuer à la transmission de résistance aux humains, aux animaux et aux écosystèmes. La détection de ces carbapénémases chez les oiseaux sauvages souligne également l'ampleur de la pollution environnementale due à ces gènes, mettant en évidence la complexité et la gravité de la propagation de la RAM à travers les différents compartiments écologiques.

V. Conclusions et perspectives

Conclusions

Le phénomène de la RAM est très complexe et ne connait ni frontières géographiques ni barrières d'espèces. Le but de ce travail de thèse était d'évaluer le fardeau de la RAM et sa dynamique de diffusion chez les oiseaux sauvages, en se focalisant sur deux espèces différentes, l'une étant migratoire (les étourneaux) et l'autre péri-domestique (les pigeons). Nos résultats ont révélé que les étourneaux comme les pigeons sont des réservoirs et vecteurs potentiels de gènes de résistance d'intérêt clinique majeur classés comme priorité critique par l'OMS. La proportion d'Enterobacterales productrices de BLSE était cependant bien plus élevée chez les étourneaux (21,5%) que chez les pigeons (5,8%). Ces oiseaux migratoires, se déplacent en immenses colonies et migrant à travers beaucoup de pays, ont donc clairement la capacité de disséminer des bactéries résistantes et mériteront d'être étudiés à l'avenir.

Nos résultats soulèvent la question de l'origine de ces résistances chez ces oiseaux. Ils révèlent très probablement l'impact de l'environnement contaminé par des bactéries résistantes sur ces oiseaux, mais les activités anthropogéniques ne sont sûrement pas les seuls incriminés. En effet, les isolats caractérisés dans les deux études de cette thèse ne peuvent pour la plupart pas être attribués directement à une source humaine. Chez les étourneaux, un tiers des *Escherichia* isolés appartenaient à l'espèce *marmotae*, qui tire plutôt son origine dans la faune sauvage, et les clones d'*E. coli* ainsi que les plasmides circulants n'avaient pas des caractéristiques typiquement d'origine humaine. Cependant, des clones pandémiques ont été isolés, comme les *E. coli* ST38, ST155 et ST162, le gène *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ largement diffusé chez les étourneaux est aussi prévalent chez l'Homme. Il en est de même chez les pigeons : les clones observés n'étaient pas d'origine humaine, mais un des plasmides caractérisé (IncF/F- :A- :B53) est connu pour sa large diffusion dans tous les secteurs y compris humain. Par ailleurs, la résistance aux carbapénèmes chez deux *P. putida*, conférée par *bla*$_{\text{VIM-2}}$, pourrait avoir une origine humaine. Par conséquent, nos résultats mettent en évidence l'interconnexion complexe entre la santé humaine, animale et environnementale, en montrant que les bactéries résistantes et les gènes de résistance qui circulent activement dans la triade Homme-animal- environnement permettent des échanges complexes, multiples et

croisés, qui rendent difficiles l'attribution d'une source à posteriori. Dans tous les cas, ces oiseaux pourraient jouer un rôle important dans la diffusion de la RAM en étant vecteurs de résistance, notamment par leurs excréments, sur leurs trajets migratoires à travers les continents. Ils sont également une source d'amplification de la RAM, des phénomènes de diffusion clonale ayant été mis en évidence chez les étourneaux comme chez les pigeons, probablement facilités par les contacts directs entre les oiseaux vivant en colonies denses. Et finalement ils peuvent aussi être une source de diversification, puisque des échanges de plasmides entre fonds génétiques différents, y compris entre *E. coli* et *E. marmotae*, ont été identifiés.

Nos résultats soulignent également l'importance d'une collaboration interdisciplinaire et internationale dans le cadre du concept « One Health » pour relever le défi mondial complexe et évolutif de la résistance aux antibiotiques, tout en protégeant la santé publique, la santé animale et l'environnement dans son ensemble. Ils révèlent ainsi l'importance de cette approche globale et interdisciplinaire dans la compréhension de la dynamique de la dissémination de la RAM tout en montrant le potentiel de ces études épidémiologique et moléculaire dans l'évaluation des contextes particulièrement à risque, puis dans la surveillance de la RAM dans les différents écosystèmes permettant ainsi de comprendre la dynamique de la circulation et la diffusion de la RAM. Finalement, nos données ont contribué à enrichir la base de connaissance fondée sur la surveillance de la RAM et la recherche dans la triade Homme-animal-environnement, cet axe fondamental qui a été établie dans le cadre du plan d'action national 2019-2023 fondée sur le concept "One Health" et visant à lutter contre la RAM en Tunisie.

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse mettent en évidence la nécessité de poursuivre la recherche sur les oiseaux sauvages et ouvrent diverses perspectives importantes pour mieux comprendre les mécanismes et la dynamique de transmission des gènes de résistance aux antibiotiques au sein de ces populations d'oiseaux et évaluer le risque sur la santé humaine.

D'abord, il est impératif de réaliser des études complémentaires afin d'évaluer l'impact de ces résistances chez les populations d'oiseaux étudiées sur la santé humaine et les écosystèmes voisins. Nous sommes conscients de l'importance de réaliser des études dans des environnements plus spécifiques afin d'évaluer l'impact de ces résistances portées par ces oiseaux et permettent de décider si ces espèces doivent être vraiment surveillées. Cela sera sur la première ligne de nos perspectives. Par exemple, pour les pigeons, il sera important de reprendre l'échantillonnage en incluant les Hommes (les fermiers), les autres animaux d'élevage des fermes, le sol, les eaux, les alimentations de ces animaux et l'environnement partagé entre ces différentes espèces afin de déterminer s'il existe vraiment une éventuelle dissémination de ces bactéries résistances entre ces différents compartiments. Il sera ainsi nécessaire de quantifier la résistance et de déterminer s'il y'a plus d'infections humaines en présence de ces oiseaux. En outre, des études épidémiologiques approfondies sont nécessaires, afin d'évaluer le risque que les étourneaux porteurs de bactéries multirésistantes peuvent représenter pour la santé humaine. Ceci pourrait être réalisé par l'identification des bactéries résistantes chez les humains qui sont en contact étroit avec ces oiseaux, y compris ceux qui les mangent, les manipulent et les vendent ainsi que les chasseurs. Il serait essentiel d'étudier le degré de clonalité des souches bactériennes isolées dans ces deux populations, et de caractériser les déterminants génétiques ce qui aiderait à déterminer s'il existe effectivement une transmission verticale des gènes de résistance. En outre, il est essentiel d'évaluer si ces bactéries résistantes ont réellement le potentiel de provoquer des infections zoonotiques chez l'Homme. Cela nécessiterait des études de cas, des enquêtes épidémiologiques et des analyses approfondies.

Il est également important d'évaluer et de quantifier les interactions entre les oiseaux migrateurs et les animaux d'élevage afin de déterminer le risque de transmission de ces bactéries résistantes à cette interface. Cela pourrait inclure des études visant à déterminer si les oiseaux migrateurs contaminent les animaux d'élevage via l'environnement partagé, l'eau, la nourriture le sol et d'autres vecteurs potentiels. Ces recherches permettraient d'évaluer le risque que ces bactéries résistantes représentent. D'une façon générale, lorsque les étourneaux arrivent en Tunisie et que leur nombre atteint des millions d'individus, ils colonisent principalement les champs d'agricultures où se trouvent les oliveraies, donc il sera important d'explorer tous les écosystèmes vivant dans ces endroits. Une fois que toutes les données scientifiques seront disponibles, il sera alors possible de quantifier les sources et de réellement évaluer l'impact de ces oiseaux sur le fardeau de la RAM en Tunisie.

En outre, il semble important d'explorer l'écologie microbienne de ces oiseaux migrateurs pour comprendre comment la composition microbienne évolue en réponse à la résistance aux antibiotiques. Dans cette optique, il serait aussi important d'inclure l'étude des facteurs intrinsèques dont la génétique de l'hôte, l'âge et le sexe qui peuvent significativement influencer la composition du microbiote intestinal chez ces différentes espèces d'oiseaux. Cela nécessitera la mise en place de collaborations avec des ornithologues spécialistes dans l'étude de l'écologie des oiseaux. L'analyse du microbiote pourrait inclure des analyses de la diversité microbienne et des interactions entre les différentes espèces bactériennes. Ces explorations pourraient être réalisées à l'aide de méthodes avancées de séquençage à haut débit, telles que la métagénomique, qui permettrait de caractériser plus précisément les gènes de résistance et leurs vecteurs génétiques. Cela permettrait de mieux comprendre les mécanismes de transfert de ces gènes. Il est aussi possible d'utiliser des modèles mathématiques et de simulation pour prédire la propagation potentielle de la résistance aux antibiotiques chez les oiseaux migrateurs. Cependant, cette approche nécessite une quantité importante des données à savoir un nombre important d'échantillons, et des points d'échantillonnage multiples recouvrant un large espace où les oiseaux se trouvent, ainsi que le suivi de ces oiseaux sur une plus longue période pendant leur séjour dans différentes régions.

De plus, il est essentiel d'effectuer un suivi à long terme des populations d'étourneaux migrateurs en Tunisie pendant leur période de séjour (6 mois). En effet, des études étendues et complètes à large échelle visant à suivre les mouvements des étourneaux et même les pigeons à l'aide des systèmes de traçage GPS semblent importantes. Ces études permettraient de détecter la présence des bactéries et de gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement dans le temps et l'espace. Cela pourrait être un outil efficace d'une part pour comprendre comment ces oiseaux disséminent la RAM à travers les différents écosystèmes et habitats, et d'autre part pour prendre en compte les facteurs environnementaux qui pourrait en influencer ou modifier la prévalence de la RAM chez ces oiseaux.

Nos résultats ont montré qu'une proportion importante des étourneaux (21,4%) possédaient des Enterobacterales porteuses de BLSE. Les routes de migration de ces étourneaux se croisent avec les trajets migratoires d'autres espèces d'oiseaux ; ces zones où différentes espèces d'oiseaux se rencontrent et séjournent sont assurément des points chauds de transmission qui méritent d'être étudiées. En effet, à travers des études comparatives entre les étourneaux et d'autres espèces d'oiseaux sauvages migrateurs, nous pourrons peut-être évaluer la spécificité des mécanismes de résistance chez chacune des espèces étudiées et identifier si certaines espèces ont une propension particulière à porter des gènes de résistance, et s'il y a dissémination de la résistance entre certaines espèces. La recherche pourrait être étendue, par exemple, aux oiseaux de mer migrateurs, tels que les mouettes. Ces oiseaux sont également migrateurs et séjournent en Tunisie, et il est très probable que ces oiseaux se croisent avec les étourneaux. Les zones côtières de la Tunisie, en particulier les régions telle que Bizerte, bordée par la mer Méditerranée, pourrait constituer un site d'étude pertinent. Cette région est géographiquement et écologiquement diversifiée, avec des zones côtières, des lagunes et une riche biodiversité marine. Ces caractéristiques en font un hotspot potentiel pour la rencontre de nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs et marins, offrant une opportunité d'étudier les mécanismes de résistance aux antibiotiques dans un contexte écologique diversifié.

Finalement, compte tenu de la nature migratoire des oiseaux, il serait intéressant d'établir des études à large échelle fondées sur la collaboration internationale avec d'autres organismes de recherche afin de surveiller la résistance chez les

étourneaux tout au long de leurs routes de migration, car cela permettrait peut-être d'identifier les sources de contamination chez ces oiseaux et de savoir si il y'a vraiment une dispersion de la RAM à une échelle internationale, ce qui permettrait par la suite de mettre en place des stratégies de prévention.

Références bibliographiques

A, H., Jr, K., Rc, L., 1993. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. J. Biol. Chem. 268.

Abdallah, H.M., Reuland, E.A., Wintermans, B.B., Naiemi, N. al, Koek, A., Abdelwahab, A.M., Ammar, A.M., Mohamed, A.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., 2015. Extended-Spectrum β-Lactamases and/or Carbapenemases-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Retail Chicken Meat in Zagazig, Egypt. PLOS ONE 10, e0136052. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136052

Abdel-Moein, K.A., Samir, A., 2014. Occurrence of extended spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae among pet dogs and cats: an emerging public health threat outside health care facilities. Am. J. Infect. Control 42, 796–798. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.03.020

Abdi, S.N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Kafil, H.S., 2020. Acinetobacter baumannii Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. Infect. Drug Resist. 13, 423–434. https://doi.org/10.2147/IDR.S228089

Aberkane, S., Compain, F., Barraud, O., Ouédraogo, A., Bouzinbi, N., Vittecoq, M., Jean-Pierre, H., Decré, D., Godreuil, S., 2015. Non-O1/Non-O139 Vibrio cholerae Avian Isolate from France Cocarrying the blaVIM-1 and blaVIM-4 Genes. Antimicrob. Agents Chemother. 59. https://doi.org/10.1128/AAC.00400-15

Abraham, E.P., Chain, E., Fletcher, C.M., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Florey, H.W., 1941. FURTHER OBSERVATIONS ON PENICILLIN. The Lancet, Originally published as Volume 2, Issue 6155 238, 177–189. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)72122-2

Abujnah, A.A., Zorgani, A., Sabri, M.A.M., El-Mohammady, H., Khalek, R.A., Ghenghesh, K.S., 2015. Multidrug resistance and extended-spectrum β-lactamases genes among Escherichia coli from patients with urinary tract infections in Northwestern Libya. Libyan J. Med. 10, 10.3402/ljm.v10.26412. https://doi.org/10.3402/ljm.v10.26412

Agersø, Y., Jensen, J.D., Hasman, H., Pedersen, K., 2014. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing Escherichia coli clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. Foodborne Pathog. Dis. 11, 740–746. https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1742

Ahlstrom, C.A., Bonnedahl, J., Woksepp, H., Hernandez, J., Olsen, B., Ramey, A.M., 2018. Acquisition and dissemination of cephalosporin-resistant E. coli in migratory birds sampled at an Alaska landfill as inferred through genomic analysis. Sci. Rep. 8, 7361. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25474-w

Ahlstrom, C.A., Bonnedahl, J., Woksepp, H., Hernandez, J., Reed, J.A., Tibbitts, L., Olsen, B., Douglas, D.C., Ramey, A.M., 2019a. Satellite tracking of gulls and genomic characterization of faecal bacteria reveals environmentally mediated acquisition and dispersal of antimicrobial-resistant Escherichia coli on the Kenai Peninsula, Alaska. Mol. Ecol. 28, 2531–2545. https://doi.org/10.1111/mec.15101

Ahlstrom, C.A., Ramey, A.M., Woksepp, H., Bonnedahl, J., 2019b. Early emergence of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in gulls from Spain and Portugal. Environ. Microbiol. Rep. 11, 669–671. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12779

Ahlstrom, C.A., van Toor, M.L., Woksepp, H., Chandler, J.C., Reed, J.A., Reeves, A.B., Waldenström, J., Franklin, A.B., Douglas, D.C., Bonnedahl, J., Ramey, A.M., 2021. Evidence for continental-scale dispersal of antimicrobial resistant bacteria by landfill-foraging gulls. Sci. Total Environ. 764, 144551. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144551

Ahlstrom, C.A., Woksepp, H., Sandegren, L., Mohsin, M., Hasan, B., Muzyka, D., Hernandez, J., Aguirre, F., Tok, A., Söderman, J., Olsen, B., Ramey, A.M., Bonnedahl, J., 2022. Genomically diverse carbapenem resistant Enterobacteriaceae from wild birds provide insight into global patterns of spatiotemporal dissemination. Sci. Total Environ. 824, 153632. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153632

Ahmad, N., Joji, R.M., Shahid, M., 2023. Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. Front. Cell. Infect. Microbiol. 12, 1065796. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1065796

Ahmed, A.M., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, 2013. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic Escherichia coli isolated from septicemic broilers. Int. J. Med. Microbiol. 303, 475–483. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.06.009

Ahmed, Z.S., Elshafiee, E.A., Khalefa, H.S., Kadry, M., Hamza, D.A., 2019. Evidence of colistin resistance genes (mcr-1 and mcr-2) in wild birds and its public health implication in Egypt. Antimicrob. Resist. Infect. Control 8, 197. https://doi.org/10.1186/s13756-019-0657-5

Alcalá, L., Alonso, C.A., Simón, C., González-Esteban, C., Orós, J., Rezusta, A., Ortega, C., Torres, C., 2016. Wild Birds, Frequent Carriers of Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL) Producing Escherichia coli of CTX-M and SHV-12 Types. Microb. Ecol. 72, 861–869. https://doi.org/10.1007/s00248-015-0718-0

Aldea, I., Gibello, A., Hernández, M., Leekitcharoenphon, P., Bortolaia, V., Moreno, M.A., 2022. Clonal and plasmid-mediated flow of ESBL/AmpC genes in Escherichia coli in a commercial laying hen farm. Vet. Microbiol. 270, 109453. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109453

Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N., 2014. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. Biochemistry 53, 1565–1574. https://doi.org/10.1021/bi5000564

Alonso, C.A., Michael, G.B., Li, J., Somalo, S., Simón, C., Wang, Y., Kaspar, H., Kadlec, K., Torres, C., Schwarz, S., 2017. Analysis of blaSHV-12-carrying Escherichia coli clones and plasmids from human, animal and food sources. J. Antimicrob. Chemother. 72, 1589–1596. https://doi.org/10.1093/jac/dkx024

Alouache, S., Estepa, V., Messai, Y., Ruiz, E., Torres, C., Bakour, R., 2014. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. Microb. Drug Resist. Larchmt. N 20, 30–38. https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0264

Alouache, S., Kada, M., Messai, Y., Estepa, V., Torres, C., Bakour, R., 2012. Antibiotic resistance and extended-spectrum β-lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). Microbes Environ. 27, 80–86. https://doi.org/10.1264/jsme2.me11266

Anjum, M.F., Schmitt, H., Börjesson, S., Berendonk, T.U., Donner, E., Stehling, E.G., Boerlin, P., Topp, E., Jardine, C., Li, X., Li, B., Dolejska, M., Madec, J.-Y., Dagot, C., Guenther, S., Walsh, F., Villa, L., Veldman, K., Sunde, M., Krzeminski, P., Wasyl, D., Popowska, M., Järhult, J., Örn, S., Mahjoub, O., Mansour, W., Thái, Đ.N., Elving, J., Pedersen, K., 2021a. The potential of using E. coli as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. Curr. Opin. Microbiol. 64, 152–158. https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.011

Anjum, M.F., Schmitt, H., Börjesson, S., Berendonk, T.U., Donner, E., Stehling, E.G., Boerlin, P., Topp, E., Jardine, C., Li, X., Li, B., Dolejska, M., Madec, J.-Y., Dagot, C., Guenther, S., Walsh, F., Villa, L., Veldman, K., Sunde, M., Krzeminski, P., Wasyl, D., Popowska, M., Järhult, J., Örn, S., Mahjoub, O., Mansour, W., Thái, Đ.N., Elving, J., Pedersen, K., 2021b. The potential of using E. coli as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. Curr. Opin. Microbiol. 64, 152–158. https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.011

Anssour, L., Messai, Y., Derkaoui, M., Alouache, S., Estepa, V., Somalo, S., Torres, C., Bakour, R., 2014. ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and blaCMY-4 in Algeria. J. Chemother. Florence Italy 26, 74–79. https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000115

Anyanwu, M.U., Jaja, I.F., Okpala, C.O.R., Njoga, E.O., Okafor, N.A., Oguttu, J.W., 2023. Mobile Colistin Resistance (mcr) Gene-Containing Organisms in Poultry Sector in Low- and Middle-Income Countries: Epidemiology, Characteristics, and One Health Control Strategies. Antibiotics 12, 1117. https://doi.org/10.3390/antibiotics12071117

Arnold, K.E., Williams, N.J., Bennett, M., 2016. 'Disperse abroad in the land': the role of wildlife in the dissemination of antimicrobial resistance. Biol. Lett. 12, 20160137. https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0137

Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M.I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T.H., Rasool, M.H., Shahid, A., Xueshan, X., Baloch, Z., 2021. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 771510. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510

Athar, M., Gervasoni, S., Catte, A., Basciu, A., Malloci, G., Ruggerone, P., Vargiu, A.V., 2023. Tripartite efflux pumps of the RND superfamily: what did we learn from computational studies? Microbiology 169, micro001307. https://doi.org/10.1099/mic.0.001307

Atterby, C., Ramey, A.M., Hall, G.G., Järhult, J., Börjesson, S., Bonnedahl, J., 2016. Increased prevalence of antibiotic-resistant E. coli in gulls sampled in Southcentral Alaska is associated with urban environments. Infect. Ecol. Epidemiol. 6, 32334. https://doi.org/10.3402/iee.v6.32334

Aubert, D., Naas, T., Héritier, C., Poirel, L., Nordmann, P., 2006. Functional Characterization of IS1999, an IS4 Family Element Involved in Mobilization and Expression of β-Lactam Resistance Genes. J. Bacteriol. 188, 6506–6514. https://doi.org/10.1128/JB.00375-06

Authority (EFSA), E.F.S., European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2023. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. EFSA J. 21, e07867. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867

Ayeni, F.A., Falgenhauer, J., Schmiedel, J., Schwengers, O., Chakraborty, T., Falgenhauer, L., 2020. Detection of blaCTX-M-27-encoding Escherichia coli ST206 in Nigerian poultry stocks. J. Antimicrob. Chemother. 75, 3070–3072. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa293

Bachiri, T., Bakour, S., Ladjouzi, R., Thongpan, L., Rolain, J.M., Touati, A., 2017. High rates of CTX-M-15-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in wild boars and Barbary macaques in Algeria. J. Glob. Antimicrob. Resist. 8, 35–40. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.10.005

Badau, E., 2021. A One Health perspective on the issue of the antibiotic resistance. Parasite 28, 16. https://doi.org/10.1051/parasite/2021006

Báez, J., Hernández-García, M., Guamparito, C., Díaz, S., Olave, A., Guerrero, K., Cantón, R., Baquero, F., Gahona, J., Valenzuela, N., Del Campo, R., Silva, J., 2015. Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing Escherichia coli colonizing the migratory Franklin's gulls (Leucophaeus pipixcan) in Antofagasta, North of Chile. Microb. Drug Resist. Larchmt. N 21, 111–116. https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0158

Baran, A., Kwiatkowska, A., Potocki, L., 2023. Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. Int. J. Mol. Sci. 24, 5777. https://doi.org/10.3390/ijms24065777

Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Zerouali, K., Timinouni, M., 2013. Prevalence and types of extended spectrum β-lactamases among urinary Escherichia coli isolates in Moroccan community. Microb. Pathog. 61–62, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.04.010

Barguigua, A., Rguibi Idrissi, H., Nayme, K., Timinouni, M., 2019. Virulence and Antibiotic Resistance Patterns in E. coli, Morocco. EcoHealth 16, 570–575. https://doi.org/10.1007/s10393-019-01404-8

Bassetti, M., Garau, J., 2021. Current and future perspectives in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections. J. Antimicrob. Chemother. 76, iv23–iv37. https://doi.org/10.1093/jac/dkab352

Bauernfeind, A., Chong, Y., Lee, K., 1998. Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? Yonsei Med. J. 39, 520–525. https://doi.org/10.3349/ymj.1998.39.6.520

Bauernfeind, A., Grimm, H., Schweighart, S., 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli. Infection 18, 294–298. https://doi.org/10.1007/BF01647010

Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., Guédon, G., 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. FEMS Microbiol. Rev. 38, 720–760. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058

Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A., Rolain, J.-M., 2016. Molecular characterisation of extended-spectrum β-lactamase- and plasmid AmpC-producing Escherichia coli strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. J. Glob. Antimicrob. Resist. 6, 108–112. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.04.006

Belmahdi, M., Chenouf, N.S., Ait Belkacem, A., Martinez-Alvarez, S., Pino-Hurtado, M.S., Benkhechiba, Z., Lahrech, S., Hakem, A., Torres, C., 2022. Extended Spectrum β-

Lactamase-Producing Escherichia coli from Poultry and Wild Birds (Sparrow) in Djelfa (Algeria), with Frequent Detection of CTX-M-14 in Sparrow. Antibiotics 11, 1814. https://doi.org/10.3390/antibiotics11121814

Ben Said, L., Jouini, A., Alonso, C.A., Klibi, N., Dziri, R., Boudabous, A., Ben Slama, K., Torres, C., 2016. Characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia. Sci. Total Environ. 550, 1103–1109. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.042

Ben Slama, K., Ben Sallem, R., Jouini, A., Rachid, S., Moussa, L., Sáenz, Y., Estepa, V., Somalo, S., Boudabous, A., Torres, C., 2011. Diversity of Genetic Lineages Among CTX-M-15 and CTX-M-14 Producing Escherichiacoli Strains in a Tunisian Hospital. Curr. Microbiol. 62, 1794–1801. https://doi.org/10.1007/s00284-011-9930-4

Ben Tanfous, F., Achour, W., Raddaoui, A., Ben Hassen, A., 2018. Molecular characterisation and epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates from immunocompromised patients in Tunisia. J. Glob. Antimicrob. Resist. 13, 154–160. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.12.014

Ben Yahia, H., Ben Sallem, R., Tayh, G., Klibi, N., Ben Amor, I., Gharsa, H., Boudabbous, A., Ben Slama, K., 2018a. Detection of CTX-M-15 harboring Escherichia coli isolated from wild birds in Tunisia. BMC Microbiol. 18, 26. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1163-2

Ben Yahia, H., Chairat, S., Gharsa, H., Alonso, C.A., Ben Sallem, R., Porres-Osante, N., Hamdi, N., Torres, C., Ben Slama, K., 2020. First Report of KPC-2 and KPC-3-Producing Enterobacteriaceae in Wild Birds in Africa. Microb. Ecol. 79, 30–37. https://doi.org/10.1007/s00248-019-01375-x

Ben Yahia, H., Chairat, S., Hamdi, N., Gharsa, H., Ben Sallem, R., Ceballos, S., Torres, C., Ben Slama, K., 2018b. Antimicrobial resistance and genetic lineages of faecal enterococci of wild birds: Emergence of vanA and vanB2 harbouring Enterococcus faecalis. Int. J. Antimicrob. Agents 52, 936–941. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.05.005

Benavides, J.A., Godreuil, S., Opazo-Capurro, A., Mahamat, O.O., Falcon, N., Oravcova, K., Streicker, D.G., Shiva, C., 2022. Long-term maintenance of multidrug-resistant Escherichia coli carried by vampire bats and shared with livestock in Peru. Sci. Total Environ. 810, 152045. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152045

Bennett, P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br. J. Pharmacol. 153, S347–S357. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607

Bevan, E.R., Jones, A.M., Hawkey, P.M., 2017. Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. J. Antimicrob. Chemother. 72, 2145–2155. https://doi.org/10.1093/jac/dkx146

Bird life international, 2019. Sturnus vulgaris. The IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species. URL https://www.iucnredlist.org/en (accessed 8.3.23).

Birdlife international, 2019. Columba livia (amended version of 2016 assessment) [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species. URL

https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22690066A155493121.en (accessed 8.4.23).

Birgy, A., Madhi, F., Hogan, J., Doit, C., Gaschignard, J., Caseris, M., Bidet, P., Cohen, R., Bonacorsi, S., 2018. CTX-M-55-, MCR-1-, and FosA-Producing Multidrug-Resistant Escherichia coli Infection in a Child in France. Antimicrob. Agents Chemother. 62, e00127-18. https://doi.org/10.1128/AAC.00127-18

Bitto, N.J., Chapman, R., Pidot, S., Costin, A., Lo, C., Choi, J., D'Cruze, T., Reynolds, E.C., Dashper, S.G., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Stinear, T.P., Stacey, K.J., Ferrero, R.L., 2017. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. Sci. Rep. 7, 7072. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07288-4

Blaak, H., van Hoek, A.H.A.M., Hamidjaja, R.A., van der Plaats, R.Q.J., Kerkhof-de Heer, L., de Roda Husman, A.M., Schets, F.M., 2015. Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing E. coli in the Poultry Farm Environment. PLoS ONE 10, e0135402. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135402

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat. Rev. Microbiol. 13, 42–51. https://doi.org/10.1038/nrmicro3380

Blount, Z.D., n.d. The unexhausted potential of E. coli. eLife 4, e05826. https://doi.org/10.7554/eLife.05826

Bodt, L.H., Rollins, L.A., Zichello, J.M., 2020. Contrasting mitochondrial diversity of European starlings (Sturnus vulgaris) across three invasive continental distributions. Ecol. Evol. 10, 10186–10195. https://doi.org/10.1002/ece3.6679

Bogaerts, P., Huang, T.-D., Bouchahrouf, W., Bauraing, C., Berhin, C., El Garch, F., Glupczynski, Y., 2015. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing Enterobacteriaceae from Diseased Companion Animals in Europe. Microb. Drug Resist. 21, 643–650. https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0284

Bonardi, S., Pitino, R., 2019. Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. Ital. J. Food Saf. 8, 7956. https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.7956

Bonnedahl, J., Drobni, M., Gauthier-Clerc, M., Hernandez, J., Granholm, S., Kayser, Y., Melhus, Å., Kahlmeter, G., Waldenström, J., Johansson, A., Olsen, B., 2009. Dissemination of Escherichia coli with CTX-M Type ESBL between Humans and Yellow-Legged Gulls in the South of France. PLoS ONE 4, e5958. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005958

Bonnedahl, J., Olsen, B., Waldenström, J., Broman, T., Jalava, J., Huovinen, P., Österblad, M., 2008. Antibiotic susceptibility of faecal bacteria in Antarctic penguins. Polar Biol. 31, 759–763. https://doi.org/10.1007/s00300-008-0430-3

Bonnet, R., 2004. Growing Group of Extended-Spectrum β-Lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1–14. https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004

Bonomo, R.A., 2017. β-Lactamases: A Focus on Current Challenges. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 7, a025239. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239

Bouaziz, A., Loucif, L., Ayachi, A., Guehaz, K., Bendjama, E., Rolain, J.-M., 2018. Migratory White Stork (Ciconia ciconia): A Potential Vector of the OXA-48-Producing Escherichia coli ST38 Clone in Algeria. Microb. Drug Resist. Larchmt. N 24, 461–468. https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0174

Boudjelas, S., Browne, M., De Poorter, M., Lowe, S., 2000. 100 of the world's worst invasive alien species : a selection from the Global Invasive Species Database. IUCN.

Boyd, S.E., Livermore, D.M., Hooper, D.C., Hope, W.W., 2020. Metallo-β-Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. Antimicrob. Agents Chemother. 64, e00397-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00397-20

Braun, S.D., Ahmed, M.F.E., El-Adawy, H., Hotzel, H., Engelmann, I., Wei, D., Monecke, S., Ehricht, R., 2016. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamase-producing escherichia coli in dairy cattle farms in the nile delta, Egypt. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01020

Braz, V.S., Melchior, K., Moreira, C.G., 2020. Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10, 548492. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492

Brogan, D.M., Mossialos, E., 2016. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. Glob. Health 12, 8. https://doi.org/10.1186/s12992-016-0147-y

Browne, A.J., Chipeta, M.G., Haines-Woodhouse, G., Kumaran, E.P.A., Hamadani, B.H.K., Zaraa, S., Henry, N.J., Deshpande, A., Reiner, R.C., Day, N.P.J., Lopez, A.D., Dunachie, S., Moore, C.E., Stergachis, A., Hay, S.I., Dolecek, C., 2021. Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. Lancet Planet. Health 5, e893–e904. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00280-1

Bueno, T.S., Loiko, M.R., Vidaletti, M.R., de Oliveira, J.A., Fetzner, T., Cerva, C., de Moraes, L.B., De Carli, S., Siqueira, F.M., Rodrigues, R.O., Coppola, M. de M., Callegari-Jacques, S.M., Mayer, F.Q., 2022a. Multidrug-resistant Escherichia coli from free-living pigeons (Columba livia): Insights into antibiotic environmental contamination and detection of resistance genes. Zoonoses Public Health 69, 682–693. https://doi.org/10.1111/zph.12957

Bueno, T.S., Loiko, M.R., Vidaletti, M.R., de Oliveira, J.A., Fetzner, T., Cerva, C., de Moraes, L.B., De Carli, S., Siqueira, F.M., Rodrigues, R.O., Coppola, M. de M., Callegari-Jacques, S.M., Mayer, F.Q., 2022c. Multidrug-resistant Escherichia coli from free-living pigeons (Columba livia): Insights into antibiotic environmental contamination and detection of resistance genes. Zoonoses Public Health 69, 682–693. https://doi.org/10.1111/zph.12957

Bush, K., Bradford, P.A., 2020. Epidemiology of β-Lactamase-Producing Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 33, e00047-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19

Cabe, P.R., 2021. European Starlings (Sturnus vulgaris) as Vectors and Reservoirs of Pathogens Affecting Humans and Domestic Livestock. Anim. Open Access J. MDPI 11, 466. https://doi.org/10.3390/ani11020466

Caltagirone, M., Nucleo, E., Spalla, M., Zara, F., Novazzi, F., Marchetti, V.M., Piazza, A., Bitar, I., De Cicco, M., Paolucci, S., Pilla, G., Migliavacca, R., Pagani, L., 2017. Occurrence of Extended Spectrum β-Lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-

Producing Enterobacteriaceae from Wells, River Water, and Wastewater Treatment Plants in Oltrepò Pavese Area, Northern Italy. Front. Microbiol. 8.

Cantón, R., Coque, T.M., 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr. Opin. Microbiol. 9, 466–475. https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011

Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M., 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14 Suppl 1, 144–153. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x

Carlson, J.C., Hyatt, D.R., Bentler, K., Mangan, A.M., Russell, M., Piaggio, A.J., Linz, G.M., 2015. Molecular characterization of Salmonella enterica isolates associated with starling-livestock interactions. Vet. Microbiol. 179, 109–118. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.015

Castanheira, M., Simner, P.J., Bradford, P.A., 2021. Extended-spectrum β-lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. JAC-Antimicrob. Resist. 3, dlab092. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092

Cerdà-Cuéllar, M., Moré, E., Ayats, T., Aguilera, M., Muñoz-González, S., Antilles, N., Ryan, P.G., González-Solís, J., 2019. Do humans spread zoonotic enteric bacteria in Antarctica? Sci. Total Environ. 654, 190–196. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.272

Chandler, J.C., Anders, J.E., Blouin, N.A., Carlson, J.C., LeJeune, J.T., Goodridge, L.D., Wang, B., Day, L.A., Mangan, A.M., Reid, D.A., Coleman, S.M., Hopken, M.W., Bisha, B., 2020a. The Role of European Starlings (Sturnus vulgaris) in the Dissemination of Multidrug-Resistant Escherichia coli among Concentrated Animal Feeding Operations. Sci. Rep. 10, 8093. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64544-w

Chandler, J.C., Anders, J.E., Blouin, N.A., Carlson, J.C., LeJeune, J.T., Goodridge, L.D., Wang, B., Day, L.A., Mangan, A.M., Reid, D.A., Coleman, S.M., Hopken, M.W., Bisha, B., 2020b. The Role of European Starlings (Sturnus vulgaris) in the Dissemination of Multidrug-Resistant Escherichia coli among Concentrated Animal Feeding Operations. Sci. Rep. 10, 8093. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64544-w

Chérif, T., Saidani, M., Decré, D., Boutiba-Ben Boubaker, I., Arlet, G., 2015. Cooccurrence of Multiple AmpC β-Lactamases in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis in Tunisia. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 44–51. https://doi.org/10.1128/AAC.00828-15

Cho, S., Jackson, C.R., Frye, J.G., 2023a. Freshwater environment as a reservoir of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae. J. Appl. Microbiol. 134, lxad034. https://doi.org/10.1093/jambio/lxad034

Chouchani, C., Marrakchi, R., El Salabi, A., 2011. Evolution of β-lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia. Crit. Rev. Microbiol. 37, 167–177. https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.552880

Christaki, E., Marcou, M., Tofarides, A., 2020. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. J. Mol. Evol. 88, 26–40. https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3

Chung, D.M., Ferree, E., Simon, D.M., Yeh, P.J., 2018. Patterns of Bird-Bacteria Associations. EcoHealth 15, 627–641. https://doi.org/10.1007/s10393-018-1342-5

Clermont, O., Gordon, D.M., Brisse, S., Walk, S.T., Denamur, E., 2011. Characterization of the cryptic Escherichia lineages: rapid identification and prevalence. Environ. Microbiol. 13, 2468–2477. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x

Cloeckaert, A., Praud, K., Doublet, B., Demartin, M., Weill, F.-X., 2006. Variant Salmonella Genomic Island 1-L Antibiotic Resistance Gene Cluster in Salmonella enterica Serovar Newport. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 3944–3946. https://doi.org/10.1128/AAC.00697-06

Coertze, R.D., Bezuidenhout, C.C., 2019. Global distribution and current research of AmpC beta-lactamase genes in aquatic environments: A systematic review. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 252, 1633–1642. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.106

Cormier, A., Zhang, P.L.C., Chalmers, G., Weese, J.S., Deckert, A., Mulvey, M., McAllister, T., Boerlin, P., 2019. Diversity of CTX-M-positive Escherichia coli recovered from animals in Canada. Vet. Microbiol. 231, 71–75. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.031

Cornell Lab of Ornithology, 2023. Rock Pigeon Life History, All About Birds. [WWW Document]. URL https://www.allaboutbirds.org/guide/Rock_Pigeon/lifehistory#habitat (accessed 8.4.23).

Cornell Lab of Ornithology, 2022. Rock Pigeon - Carte de distribution - Statuts et tendances eBird [WWW Document]. eBird. URL https://science.ebird.org/status-and-trends/species/rocpig/range-map (accessed 9.30.23).

Cornell University, 2023. European Starling Life History, All About Birds, Cornell Lab of Ornithology [WWW Document]. Birds. URL https://www.allaboutbirds.org/guide/European_Starling/lifehistory (accessed 9.19.23).

Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2006. Detection of Escherichia coli harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. J. Antimicrob. Chemother. 58, 1311–1312. https://doi.org/10.1093/jac/dkl415

Courpon-Claudinon, A., Lefort, A., Panhard, X., Clermont, O., Dornic, Q., Fantin, B., Mentré, F., Wolff, M., Denamur, E., Branger, C., COLIBAFI Group, 2011. Bacteraemia caused by third-generation cephalosporin-resistant Escherichia coli in France: prevalence, molecular epidemiology and clinical features. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17, 557–565. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03298.x

Cummins, M.L., Hamidian, M., Djordjevic, S.P., 2020. Salmonella Genomic Island 1 is Broadly Disseminated within Gammaproteobacteriaceae. Microorganisms 8, 161. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020161

Cunha, M.P.V., Oliveira, M.C.V., Oliveira, M.G.X., Menão, M.C., Knöbl, T., 2019. CTX-M-producing Escherichia coli Isolated from urban pigeons (Columba livia domestica) in Brazil. J. Infect. Dev. Ctries. 13, 1052–1056. https://doi.org/10.3855/jidc.11441

Dandachi, I., Chabou, S., Daoud, Z., Rolain, J.-M., 2018. Prevalence and Emergence of Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram

Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin. Front. Microbiol. 9, 2299. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02299

D'Andrea, M.M., Arena, F., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., 2013. CTX-M-type β-lactamases: A successful story of antibiotic resistance. Int. J. Med. Microbiol., Special Issue Antibiotic Resistance 303, 305–317. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008

Dantas Palmeira, J., Ferreira, H.M.N., 2020. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production – a threat around the world. Heliyon 6, e03206. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03206

Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M.S., Alav, I., Webber, M.A., Blair, J.M.A., 2023a. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. Nat. Rev. Microbiol. 21, 280–295. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y

Datta, N., Kontomichalou, P., 1965. Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae. Nature 208, 239–241. https://doi.org/10.1038/208239a0

Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 74, 417–433. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10

D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. Nature 477, 457–461. https://doi.org/10.1038/nature10388

De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Tumbarello, M., 2020a. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β-Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. Int. J. Mol. Sci. 21, 5090. https://doi.org/10.3390/ijms21145090

de Kraker, M.E.A., Stewardson, A.J., Harbarth, S., 2016. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? PLoS Med. 13, e1002184. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184

de Oliveira, M.C.V., Camargo, B.Q., Cunha, M.P.V., Saidenberg, A.B., Teixeira, R.H.F., Matajira, C.E.C., Moreno, L.Z., Gomes, V.T.M., Christ, A.P.G., Barbosa, M.R.F., Sato, M.I.Z., Moreno, A.M., Knöbl, T., 2018. Free-Ranging Synanthropic Birds (Ardea alba and Columba livia domestica) as Carriers of Salmonella spp. and Diarrheagenic Escherichia coli in the Vicinity of an Urban Zoo. Vector-Borne Zoonotic Dis. 18, 65–69. https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2174

De Witte, C., Vereecke, N., Theuns, S., De Ruyck, C., Vercammen, F., Bouts, T., Boyen, F., Nauwynck, H., Haesebrouck, F., 2021. Presence of Broad-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Zoo Mammals. Microorganisms 9, 834. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040834

Despotovic, M., de Nies, L., Busi, S.B., Wilmes, P., 2023. Reservoirs of antimicrobial resistance in the context of One Health. Curr. Opin. Microbiol. 73, 102291. https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102291

Di Marcantonio, L., Romantini, R., Marotta, F., Chiaverini, A., Zilli, K., Abass, A., Di Giannatale, E., Garofolo, G., Janowicz, A., 2022. The Current Landscape of Antibiotic Resistance of Salmonella Infantis in Italy: The Expansion of Extended-Spectrum

Beta-Lactamase Producers on a Local Scale. Front. Microbiol. 13, 812481. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.812481

Dobiasova, H., Dolejska, M., 2016. Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and β-lactam resistance genes in Escherichia coli originating from diverse sources and geographical areas. J. Antimicrob. Chemother. 71, 2118–2124. https://doi.org/10.1093/jac/dkw144

Dolejska, M., 2020. Antibiotic-Resistant Bacteria in Wildlife, in: Manaia, C.M., Donner, E., Vaz-Moreira, I., Hong, P. (Eds.), Antibiotic Resistance in the Environment : A Worldwide Overview, The Handbook of Environmental Chemistry. Springer International Publishing, Cham, pp. 19–70. https://doi.org/10.1007/698_2020_467

Dolejska, M., Literak, I., 2019. Wildlife Is Overlooked in the Epidemiology of Medically Important Antibiotic-Resistant Bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 63, e01167-19. https://doi.org/10.1128/AAC.01167-19

Dolejska, M., Masarikova, M., Dobiasova, H., Jamborova, I., Karpiskova, R., Havlicek, M., Carlile, N., Priddel, D., Cizek, A., Literak, I., 2016. High prevalence of Salmonella and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia. J. Antimicrob. Chemother. 71, 63–70. https://doi.org/10.1093/jac/dkv306

Dziri, O., Dziri, R., Ali El Salabi, A., Chouchani, C., 2020. Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacteria in Tunisia: History of Thirteen Years of Challenge. Infect. Drug Resist. 13, 4177–4191. https://doi.org/10.2147/IDR.S259562

ECDC, EFSA, EMA, 2021. JIACRA III - Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and animals. [WWW Document] URL https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/third-joint-interagency-antimicrobial-consumption-and-resistance-analysis-report (09. 21.2023)

EMA, 2018. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) [WWW Document]. Eur. Med. Agency. URL https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac (accessed 9.16.23).

Escudero, J.A., Loot, C., Nivina, A., Mazel, D., 2015. The Integron: Adaptation On Demand. Microbiol. Spectr. 3, 3.2.10. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014

European Centre for Disease Prevention and Control, 2022a. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA - A One Health response. [WWW Document]. URL https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-eueea-one-health-response (accessed 9.21.23).

European Centre for Disease Prevention and Control, 2022b. European Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses Network (FWD-Net) [WWW Document]. URL https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/fwd-net (accessed 9.16.23).

Evans, B.A., Amyes, S.G.B., 2014a. OXA β-Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 27, 241–263. https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13

Ewbank, A.C., Fuentes-Castillo, D., Sacristán, C., Cardoso, B., Esposito, F., Fuga, B., de Macedo, E.C., Lincopan, N., Catão-Dias, J.L., 2022a. Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli survey in wild seabirds at a pristine atoll

in the southern Atlantic Ocean, Brazil: First report of the O25b-ST131 clone harboring blaCTX-M-8. Sci. Total Environ. 806, 150539. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150539

Ewbank, A.C., Fuentes-Castillo, D., Sacristán, C., Esposito, F., Fuga, B., Cardoso, B., Godoy, S.N., Zamana, R.R., Gattamorta, M.A., Catão-Dias, J.L., Lincopan, N., 2022b. World Health Organization critical priority Escherichia coli clone ST648 in magnificent frigatebird (Fregata magnificens) of an uninhabited insular environment. Front. Microbiol. 13, 940600. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.940600

Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L.H., 2012. Extended-spectrum β-lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clin. Microbiol. Infect. 18, 646–655. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x

FAO;UNEP;WHO;WOAH, 2022. One Health Joint Plan of Action (2022-2026) - Working together for the health of humans, animals, plants and the environment. FAO;UNEP;WHO;WOAH 86 p. WW]Document]. URL https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240059139

Findlay, J., Gould, V.C., North, P., Bowker, K.E., Williams, M.O., MacGowan, A.P., Avison, M.B., 2020. Characterization of cefotaxime-resistant urinary Escherichia coli from primary care in South-West England 2017-18. J. Antimicrob. Chemother. 75, 65–71. https://doi.org/10.1093/jac/dkz397

Fischer, J., Schmoger, S., Jahn, S., Helmuth, R., Guerra, B., 2013a. NDM-1 carbapenemase-producing Salmonella enterica subsp. enterica serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany. J. Antimicrob. Chemother. 68, 2954–2956. https://doi.org/10.1093/jac/dkt260

Fleming, A., 1980. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10:226-236, 1929. Rev. Infect. Dis. 2, 129–139.

Fleming, A., 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzæ. Br. J. Exp. Pathol. 10, 226–236.

François, J., 2023. Étourneau sansonnet - Sturnus vulgaris - Common Starling [WWW Document]. Oiseaux.net. URL https://www.oiseaux.net/oiseaux/etourneau.sansonnet.html (accessed 9.19.23).

Franklin, A.B., Ramey, A.M., Bentler, K.T., Barrett, N.L., McCurdy, L.M., Ahlstrom, C.A., Bonnedahl, J., Shriner, S.A., Chandler, J.C., 2020. Gulls as Sources of Environmental Contamination by Colistin-resistant Bacteria. Sci. Rep. 10, 4408. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61318-2

Freire, S., Grilo, T., Poirel, L., Aires-de-Sousa, M., 2022. Urban Pigeons (Columba livia) as a Source of Broad-Spectrum β-Lactamase-Producing Escherichia coli in Lisbon, Portugal. Antibiotics 11, 1368. https://doi.org/10.3390/antibiotics11101368

Freire, S., Grilo, T., Rodrigues, B., Oliveira, R., Esteves, C., Marques, A., Poirel, L., Aires-de-Sousa, M., 2023. ESBL- and Carbapenemase-Producing Escherichia coli and

Klebsiella pneumoniae among Bivalves from Portuguese Shellfish Production Areas. Microorganisms 11, 415. https://doi.org/10.3390/microorganisms11020415

Freitag, C., Michael, G.B., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Hassel, M., Schwarz, S., 2018. Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among Escherichia coli isolates from fresh vegetables. Vet. Microbiol. 219, 63–69. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.028

Gadau, A., Crawford, M.S., Mayek, R., Giraudeau, M., McGraw, K.J., Whisner, C.M., Kondrat-Smith, C., Sweazea, K.L., 2019. A comparison of the nutritional physiology and gut microbiome of urban and rural house sparrows (Passer domesticus). Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 237, 110332. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.110332

Garde, S., Chodisetti, P.K., Reddy, M., 2021. Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. EcoSal Plus 9. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020

Geser, N., Stephan, R., Hächler, H., 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet. Res. 8, 21. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-21

Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., Sekawi, Z., 2015. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. Curr. Issues Mol. Biol. 17, 11–21.

Gharout-Sait, A., Touati, A., Guillard, T., Brasme, L., de Champs, C., 2015. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in Klebsiella pneumoniae isolates. Braz. J. Infect. Dis. 19, 187–195. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.12.001

Gill, F.B., 1995. Ornithology. New York : W.H. Freeman.

González-Acuña, D., Hernández, J., Moreno, L., Herrmann, B., Palma, R., Latorre, A., Medina-Vogel, G., Kinsella, M.J., Martín, N., Araya, K., Torres, I., Fernandez, N., Olsen, B., 2013. Health evaluation of wild gentoo penguins (Pygoscelis papua) in the Antarctic Peninsula. Polar Biol. 36, 1749–1760. https://doi.org/10.1007/s00300-013-1394-5

González-Villarreal, J.A., González-Lozano, K.J., Aréchiga-Carvajal, E.T., Morlett-Chávez, J.A., Luévanos-Escareño, M.P., Balagurusamy, N., Salinas-Santander, M.A., 2022. Molecular mechanisms of multidrug resistance in clinically relevant enteropathogenic bacteria (Review). Exp. Ther. Med. 24, 753. https://doi.org/10.3892/etm.2022.11689

Gordon, D.M., Cowling, A., 2003. The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiol. Read. Engl. 149, 3575–3586. https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0

Grami, R., Dahmen, S., Mansour, W., Mehri, W., Haenni, M., Aouni, M., Madec, J.-Y., 2014. blaCTX-M-15-Carrying F2:A-:B- Plasmid in Escherichia coli from Cattle Milk in Tunisia. Microb. Drug Resist. 20, 344–349. https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0160

Grami, R., Mansour, W., Dahmen, S., Mehri, W., Haenni, M., Aouni, M., Madec, J.-Y., 2013. The blaCTX-M-1 IncI1/ST3 plasmid is dominant in chickens and pets in Tunisia. J. Antimicrob. Chemother. 68, 2950–2952. https://doi.org/10.1093/jac/dkt258

Grami, R., Mansour, W., Mehri, W., Bouallègue, O., Boujaâfar, N., Madec, J.-Y., Haenni, M., 2016. Impact of food animal trade on the spread of mcr-1-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015. Eurosurveillance 21, 30144. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30144

Grönthal, T., Österblad, M., Eklund, M., Jalava, J., Nykäsenoja, S., Pekkanen, K., Rantala, M., 2018. Sharing more than friendship - transmission of NDM-5 ST167 and CTX-M-9 ST69 Escherichia coli between dogs and humans in a family, Finland, 2015. Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 23, 1700497. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.27.1700497

Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M., Batsajkhan, N., Glupczynski, Y., Wieler, L.H., Ewers, C., 2012. Comparable High Rates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Birds of Prey from Germany and Mongolia. PLoS ONE 7, e53039. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053039

Guenther, S., Grobbel, M., Beutlich, J., Bethe, A., Friedrich, N.D., Goedecke, A., Lübke-Becker, A., Guerra, B., Wieler, L.H., Ewers, C., 2010. CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamases-producing Escherichia coli from wild birds in Germany. Environ. Microbiol. Rep. 2, 641–645. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00148.x

Haenni, M., Métayer, V., Jarry, R., Drapeau, A., Puech, M.-P., Madec, J.-Y., Keck, N., 2020. Wide Spread of blaCTX–M–9/mcr-9 IncHI2/ST1 Plasmids and CTX-M-9-Producing Escherichia coli and Enterobacter cloacae in Rescued Wild Animals. Front. Microbiol. 11, 601317. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601317

Haenni, M., Saras, E., Métayer, V., Médaille, C., Madec, J.-Y., 2014. High prevalence of blaCTX-M-1/IncI1/ST3 and blaCMY-2/IncI1/ST2 plasmids in healthy urban dogs in France. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 5358–5362. https://doi.org/10.1128/AAC.02545-14

Hammami, S., Gautier, V., Ghozzi, R., Costa, A.D., Ben-Redjeb, S., Arlet, G., 2010. Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional blaSHV2a carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa clone from Tunis. Clin. Microbiol. Infect. 16, 189–193. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03023.x

Hammoudi Halat, D., Ayoub Moubareck, C., 2020. The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. Antibiotics 9, 186. https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186

Hasan, B., Islam, K., Ahsan, M., Hossain, Z., Rashid, M., Talukder, B., Ahmed, K.U., Olsen, B., Abul Kashem, M., 2014. Fecal carriage of multi-drug resistant and extended spectrum β-lactamases producing E. coli in household pigeons, Bangladesh. Vet. Microbiol. 168, 221–224. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.033

Hassen, B., Abbassi, M.S., Ruiz-Ripa, L., Mama, O.M., Hassen, A., Torres, C., Hammami, S., 2020. High prevalence of mcr-1 encoding colistin resistance and first identification of blaCTX-M-55 in ESBL/CMY-2-producing Escherichia coli isolated from chicken

faeces and retail meat in Tunisia. Int. J. Food Microbiol. 318, 108478. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108478

Hassen, B., Abbassi, M.S., Ruiz-Ripa, L., Mama, O.M., Ibrahim, C., Benlabidi, S., Hassen, A., Torres, C., Hammami, S., 2021. Genetic characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae from a biological industrial wastewater treatment plant in Tunisia with detection of the colistin-resistance mcr-1 gene. FEMS Microbiol. Ecol. 97, fiaa231. https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa231

Helmy, M.M., Wasfi, R., 2014. Phenotypic and Molecular Characterization of Plasmid Mediated AmpC β-Lactamases among Escherichia coli, Klebsiella spp., and Proteus mirabilis Isolated from Urinary Tract Infections in Egyptian Hospitals. BioMed Res. Int. 2014, 171548. https://doi.org/10.1155/2014/171548

Hernandez, J., Bonnedahl, J., Eliasson, I., Wallensten, A., Comstedt, P., Johansson, A., Granholm, S., Melhus, Å., Olsen, B., Drobni, M., 2010. Globally disseminated human pathogenic Escherichia coli of O25b-ST131 clone, harbouring blaCTX-M-15, found in Glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia. Environ. Microbiol. Rep. 2, 329–332. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00142.x

Hernández, J., González-Acuña, D., 2016. Anthropogenic antibiotic resistance genes mobilization to the polar regions. Infect. Ecol. Epidemiol. 6, 10.3402/iee.v6.32112. https://doi.org/10.3402/iee.v6.32112

Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., Piddock, L.J.V., 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. The Lancet 387, 176–187. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0

Hounmanou, Y.M.G., Bortolaia, V., Dang, S.T.T., Truong, D., Olsen, J.E., Dalsgaard, A., 2021. ESBL and AmpC β-Lactamase Encoding Genes in E. coli From Pig and Pig Farm Workers in Vietnam and Their Association With Mobile Genetic Elements. Front. Microbiol. 12, 629139. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629139

Huang, Lulu, Wu, C., Gao, H., Xu, C., Dai, M., Huang, Lingli, Hao, H., Wang, X., Cheng, G., 2022. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. Antibiotics 11, 520. https://doi.org/10.3390/antibiotics11040520

Huguet, K.T., Rivard, N., Garneau, D., Palanee, J., Burrus, V., 2020. Replication of the Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) triggered by helper IncC conjugative plasmids promotes incompatibility and plasmid loss. PLOS Genet. 16, e1008965. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008965

Hwengwere, K., Paramel Nair, H., Hughes, K.A., Peck, L.S., Clark, M.S., Walker, C.A., 2022. Antimicrobial resistance in Antarctica: is it still a pristine environment? Microbiome 10, 71. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01250-x

Ibrahim, D.R., Dodd, C.E.R., Stekel, D.J., Meshioye, R.T., Diggle, M., Lister, M., Hobman, J.L., 2023. Multidrug-Resistant ESBL-Producing E. coli in Clinical Samples from the UK. Antibiotics 12, 169. https://doi.org/10.3390/antibiotics12010169

Ikhimiukor, O.O., Okeke, I.N., 2023. A snapshot survey of antimicrobial resistance in food-animals in low and middle-income countries. One Health Amst. Neth. 16, 100489. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100489

IOC World Bird List (v13.1), Gill, F and D Donsker (Eds), 2023. Pigeon biset - Columba livia - Rock Dove [WWW Document]. Oiseaux.net. URL https://www.oiseaux.net/oiseaux/pigeon.biset.html (accessed 8.4.23).

IUCN, 2023. IUCN Red List of Threatened Species: Sturnus vulgaris [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species. URL https://www.iucnredlist.org/en (accessed 9.19.23).

Jacoby, G.A., 2009. AmpC beta-lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 22, 161–182, Table of Contents. https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08

Jamborova, I., Dolejska, M., Vojtech, J., Guenther, S., Uricariu, R., Drozdowska, J., Papousek, I., Pasekova, K., Meissner, W., Hordowski, J., Cizek, A., Literak, I., 2015. Plasmid-Mediated Resistance to Cephalosporins and Fluoroquinolones in Various Escherichia coli Sequence Types Isolated from Rooks Wintering in Europe. Appl. Environ. Microbiol. 81, 648–657. https://doi.org/10.1128/AEM.02459-14

Jonas, O.B.I., Alec Berthe,Franck Cesar Jean Le Gall,Francois G. Marquez,Patricio V., 2017. Drug-resistant infections : a threat to our economic future (Vol. 2) : final report (Text/HTML), HNP/Agriculture Global Antimicrobial Resistance Initiative. World Bank Group., Washington, D.C.

Jørgensen, R.L., Nielsen, J.B., Friis-Møller, A., Fjeldsøe-Nielsen, H., Schønning, K., 2010. Prevalence and molecular characterization of clinical isolates of Escherichia coli expressing an AmpC phenotype. J. Antimicrob. Chemother. 65, 460–464. https://doi.org/10.1093/jac/dkp484

Jouini, A., Klibi, A., Kmiha, S., Hamrouni, S., Ghram, A., Maaroufi, A., 2022. Lineages, Virulence Gene Associated and Integrons among Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) and CMY-2 Producing Enterobacteriaceae from Bovine Mastitis, in Tunisia. Pathog. Basel Switz. 11, 948. https://doi.org/10.3390/pathogens11080948

Jouini, A., Vinué, L., Slama, K.B., Sáenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., Boudabous, A., Torres, C., 2007. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β-lactamases and associated resistance genes in Escherichia coli strains of food samples in Tunisia. J. Antimicrob. Chemother. 60, 1137–1141. https://doi.org/10.1093/jac/dkm316

Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A., 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. 33, 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

Khalaf, N.G., Eletreby, M.M., Hanson, N.D., 2009. Characterization of CTX-M ESBLs in Enterobacter cloacae, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates from Cairo, Egypt. BMC Infect. Dis. 9, 84. https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-84

Khilnani, G., Khilnani, A.K., 2019. Antibiotic Resistance. pp. 179–200. https://doi.org/10.5281/zenodo.5765831

Kimera, Z.I., Mshana, S.E., Rweyemamu, M.M., Mboera, L.E.G., Matee, M.I.N., 2020. Antimicrobial use and resistance in food-producing animals and the environment: an African perspective. Antimicrob. Resist. Infect. Control 9, 37. https://doi.org/10.1186/s13756-020-0697-x

Klein, E.Y., Van Boeckel, T.P., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H., Laxminarayan, R., 2018. Global increase and geographic convergence in

antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, E3463–E3470. https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115

Kocsis, B., Gulyás, D., Szabó, D., 2022. Emergence and Dissemination of Extraintestinal Pathogenic High-Risk International Clones of Escherichia coli. Life 12, 2077. https://doi.org/10.3390/life12122077

Koga, V.L., Maluta, R.P., da Silveira, W.D., Ribeiro, R.A., Hungria, M., Vespero, E.C., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., 2019. Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing Escherichia coli isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. BMC Microbiol. 19, 174. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1550-3

Kopotsa, K., Sekyere, J.O., Mbelle, N.M., 2019. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1457, 61–91. https://doi.org/10.1111/nyas.14223

Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Argüello, H., Berendonk, T., Cavaco, L.M., Gaze, W., Schmitt, H., Topp, E., Guerra, B., Liébana, E., Stella, P., Peixe, L., 2021. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. EFSA J. 19, e06651. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6651

Kunhikannan, S., Thomas, C.J., Franks, A.E., Mahadevaiah, S., Kumar, S., Petrovski, S., 2021. Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. MicrobiologyOpen 10, e1197. https://doi.org/10.1002/mbo3.1197

Labid, A., Benouagueni, S., Mehainaoui, A., Gacemi Kirane, D., Touati, A., 2023. Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Bacteria Isolated in the Newborn Intensive Care Unit at Abderrezak-Bouhara Hospital of Skikda, Algeria. Microb. Drug Resist. 29, 229–238. https://doi.org/10.1089/mdr.2022.0254

Laborda, P., Sanz-García, F., Ochoa-Sánchez, L.E., Gil-Gil, T., Hernando-Amado, S., Martínez, J.L., 2022a. Wildlife and Antibiotic Resistance. Front. Cell. Infect. Microbiol. 12, 873989. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873989

Lagerstrom, K.M., Hadly, E.A., n.d. The under-investigated wild side of Escherichia coli: genetic diversity, pathogenicity and antimicrobial resistance in wild animals. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 288, 20210399. https://doi.org/10.1098/rspb.2021.0399

Lagrange, J., Amat, J.-P., Ballesteros, C., Damborg, P., Grönthal, T., Haenni, M., Jouy, E., Kaspar, H., Kenny, K., Klein, B., Lupo, A., Madec, J.-Y., Salomonsen, C.M., Müller, E., Madero, C.M., Nilsson, O., Norström, M., Nykäsenoja, S., Overesch, G., Pedersen, K., Pohjanvirta, T., Slowey, R., Justo, C.T., Urdahl, A.M., Zafeiridis, C., Zini, E., Cazeau, G., Jarrige, N., Collineau, L., 2023. Pilot testing the EARS-Vet surveillance network for antibiotic resistance in bacterial pathogens from animals in the EU/EEA. Front. Microbiol. 14, 1188423. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188423

Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., Ben Moussa, M., 2014. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β-lactamase (ESBL). Médecine Mal. Infect. 44, 400–404. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.03.010

Lahlaoui, H., Moussa, M.B., 2011. CTX-M-14 type β-Lactamase producing Escherichia coli isolated from hospitalized patients in Tunisia. APMIS 119, 759–761. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02800.x

Landolsi, S., Selmi, R., Hadjadj, L., Ben Haj Yahia, A., Ben Romdhane, K., Messadi, L., Rolain, J.M., 2022. First Report of Extended-Spectrum β-Lactamase (blaCTX-M1) and Colistin Resistance Gene mcr-1 in E. coli of Lineage ST648 from Cockroaches in Tunisia. Microbiol. Spectr. 10, e00036-21. https://doi.org/10.1128/spectrum.00036-21

Lang, A.S., Zhaxybayeva, O., Beatty, J.T., 2012. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. Nat. Rev. Microbiol. 10, 472–482. https://doi.org/10.1038/nrmicro2802

Lavollay, M., Mamlouk, K., Frank, T., Akpabie, A., Burghoffer, B., Ben Redjeb, S., Bercion, R., Gautier, V., Arlet, G., 2006. Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing Escherichia coli strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2433–2438. https://doi.org/10.1128/AAC.00150-06

Leclercq, R., 2002. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. Clin. Infect. Dis. 34, 482–492. https://doi.org/10.1086/324626

Lederberg, J., Tatum, E.L., 1946. Gene recombination in Escherichia coli. Nature 158, 558. https://doi.org/10.1038/158558a0

Lee, S., An, J.-U., Woo, J., Song, H., Yi, S., Kim, W.-H., Lee, J.-H., Ryu, S., Cho, S., 2022. Prevalence, Characteristics, and Clonal Distribution of Escherichia coli Carrying Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-1.1 in Swine Farms and Their Differences According to Swine Production Stages. Front. Microbiol. 13, 873856. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.873856

LeJeune, J., Homan, J., Linz, G., Pearl, D.L., 2008. Role of the European Starling in the Transmission of E. coli O157 on Dairy Farms. Proc. Vertebr. Pest Conf. 23. https://doi.org/10.5070/V423110392

Li, J., Zhang, H., Ning, J., Sajid, A., Cheng, G., Yuan, Z., Hao, H., 2019. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. Antimicrob. Resist. Infect. Control 8, 44. https://doi.org/10.1186/s13756-019-0489-3

Liakopoulos, A., Mevius, D.J., Olsen, B., Bonnedahl, J., 2016a. The colistin resistance mcr-1 gene is going wild. J. Antimicrob. Chemother. 71, 2335–2336. https://doi.org/10.1093/jac/dkw262

Liakopoulos, A., Olsen, B., Geurts, Y., Artursson, K., Berg, C., Mevius, D.J., Bonnedahl, J., 2016b. Molecular Characterization of Extended-Spectrum-Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae from Wild Kelp Gulls in South America. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 6924–6927. https://doi.org/10.1128/AAC.01120-16

Liao, X., Yang, R.-S., Xia, J., Chen, L., Zhang, R., Fang, L.-X., Lei, F., Song, G., Jia, L., Han, L., Bai, S., Bai, R., Sun, J., Liu, Y.-H., 2019. High colonization rate of a novel carbapenem-resistant Klebsiella lineage among migratory birds at Qinghai Lake, China. J. Antimicrob. Chemother. 74, 2895–2903. https://doi.org/10.1093/jac/dkz268

Linz, G., 2007. European Starlings: A Review of an Invasive Species with Far-Reaching Impacts. www.academia.edu

Liu, S., Feng, J., Pu, J., Xu, X., Lu, S., Yang, J., Wang, Y., Jin, D., Du, X., Meng, X., Luo, X., Sun, H., Xiong, Y., Ye, C., Lan, R., Xu, J., 2019. Genomic and molecular characterisation of Escherichia marmotae from wild rodents in Qinghai-Tibet plateau as a potential pathogen. Sci. Rep. 9, 10619. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46831-3

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect. Dis. 16, 161–168. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7

Livermore, D.M., 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8, 557–584.

Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N., 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J. Antimicrob. Chemother. 59, 165–174. https://doi.org/10.1093/jac/dkl483

Loncaric, I., Stalder, G.L., Mehinagic, K., Rosengarten, R., Hoelzl, F., Knauer, F., Walzer, C., 2013. Comparison of ESBL – And AmpC Producing Enterobacteriaceae and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolated from Migratory and Resident Population of Rooks (Corvus frugilegus) in Austria. PLoS ONE 8, e84048. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084048

Lorusso, A.B., Carrara, J.A., Barroso, C.D.N., Tuon, F.F., Faoro, H., 2022. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa. Int. J. Mol. Sci. 23, 15779. https://doi.org/10.3390/ijms232415779

Lou, H., Chen, M., Black, S.S., Bushell, S.R., Ceccarelli, M., Mach, T., Beis, K., Low, A.S., Bamford, V.A., Booth, I.R., Bayley, H., Naismith, J.H., 2011. Altered antibiotic transport in OmpC mutants isolated from a series of clinical strains of multi-drug resistant E. coli. PloS One 6, e25825. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025825

Loucif, L., Chelaghma, W., Bendjama, E., Bouaziz, A., Cherak, Z., Serrar, W., Mohammed, F.S., Rolain, J.-M., 2022a. Urban pigeons as a reservoir of carbapenem resistant Enterobacterales: first report of OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae. New Microbes New Infect. 47, 100981. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2022.100981

Loucif, L., Chelaghma, W., Bendjama, E., Cherak, Z., Khellaf, M., Khemri, A., Rolain, J.-M., 2022b. Detection of blaOXA-48 and mcr-1 Genes in Escherichia coli Isolates from Pigeon (Columba livia) in Algeria. Microorganisms 10, 975. https://doi.org/10.3390/microorganisms10050975

Loucif, L., Chelaghma, W., Cherak, Z., Bendjama, E., Beroual, F., Rolain, J.-M., 2022d. Detection of NDM-5 and MCR-1 antibiotic resistance encoding genes in Enterobacterales in long-distance migratory bird species Ciconia ciconia, Algeria. Sci. Total Environ. 814, 152861. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152861

Lu, J., Ryu, H., Vogel, J., Santo Domingo, J., Ashbolt, N.J., 2013. Molecular detection of Campylobacter spp. and fecal indicator bacteria during the northern migration of sandhill cranes (Grus canadensis) at the central Platte River. Appl. Environ. Microbiol. 79, 3762–3769. https://doi.org/10.1128/AEM.03990-12

Lupo, A., Saras, E., Madec, J.-Y., Haenni, M., 2018. Emergence of blaCTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in Escherichia coli from various animal species in France. J. Antimicrob. Chemother. 73, 867–872. https://doi.org/10.1093/jac/dkx489

Maamar, E., Hammami, S., Alonso, C.A., Dakhli, N., Abbassi, M.S., Ferjani, S., Hamzaoui, Z., Saidani, M., Torres, C., Boutiba-Ben Boubaker, I., 2016. High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli from poultry in Tunisia. Int. J. Food Microbiol. 231, 69–75. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.001

Maaroufi, R., Dziri, O., Hadjadj, L., Diene, S.M., Rolain, J.-M., Chouchani, C., 2021. Occurrence of NDM-1 and VIM-2 Co-Producing Escherichia coli and OprD Alteration in Pseudomonas aeruginosa Isolated from Hospital Environment Samples in Northwestern Tunisia. Diagnostics 11, 1617. https://doi.org/10.3390/diagnostics11091617

Maciuca, I.E., Williams, N.J., Tuchilus, C., Dorneanu, O., Guguianu, E., Carp-Carare, C., Rimbu, C., Timofte, D., 2015. High Prevalence of Escherichia coli-Producing CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Poultry and Human Clinical Isolates in Romania. Microb. Drug Resist. Larchmt. N 21, 651–662. https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0248

Madec, J.-Y., Haenni, M., Nordmann, P., Poirel, L., 2017. Extended-spectrum β-lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? Clin. Microbiol. Infect. 23, 826–833. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.013

Madec, J.-Y., Poirel, L., Saras, E., Gourguechon, A., Girlich, D., Nordmann, P., Haenni, M., 2012. Non-ST131 Escherichia coli from cattle harbouring human-like blaCTX-M-15-carrying plasmids. J. Antimicrob. Chemother. 67, 578–581. https://doi.org/10.1093/jac/dkr542

Mader, R., Damborg, P., Amat, J.-P., Bengtsson, B., Bourély, C., Broens, E.M., Busani, L., Crespo-Robledo, P., Filippitzi, M.-E., Fitzgerald, W., Kaspar, H., Madero, C.M., Norström, M., Nykäsenoja, S., Pedersen, K., Pokludova, L., Urdahl, A.M., Vatopoulos, A., Zafeiridis, C., Madec, J.-Y., Eu-Jamrai, O.B.O., 2021. Building the European Antimicrobial Resistance Surveillance network in veterinary medicine (EARS-Vet). Eurosurveillance 26, 2001359. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.4.2001359

Mansour, W., Poirel, L., Bettaieb, D., Bouallegue, O., Boujaafar, N., Nordmann, P., 2009. Metallo-β-lactamase–producing Pseudomonas aeruginosa isolates in Tunisia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64, 458–461. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.04.003

Marcadé, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., Denamur, E., Arlet, G., 2009. Replicon typing of plasmids in Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 63, 67–71. https://doi.org/10.1093/jac/dkn428

Marcelino, V.R., Wille, M., Hurt, A.C., González-Acuña, D., Klaassen, M., Schlub, T.E., Eden, J.-S., Shi, M., Iredell, J.R., Sorrell, T.C., Holmes, E.C., 2019. Meta-transcriptomics reveals a diverse antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes. BMC Biol. 17, 31. https://doi.org/10.1186/s12915-019-0649-1

Marshall, S., Hujer, A.M., Rojas, L.J., Papp-Wallace, K.M., Humphries, R.M., Spellberg, B., Hujer, K.M., Marshall, E.K., Rudin, S.D., Perez, F., Wilson, B.M., Wasserman, R.B., Chikowski, L., Paterson, D.L., Vila, A.J., van Duin, D., Kreiswirth, B.N., Chambers, H.F., Fowler, V.G., Jacobs, M.R., Pulse, M.E., Weiss, W.J., Bonomo, R.A., 2017. Can Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam Overcome β-Lactam Resistance Conferred by Metallo-β-Lactamases in Enterobacteriaceae? Antimicrob. Agents Chemother. 61, e02243-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02243-16

Medeiros, A.A., 1984. Beta-lactamases. Br. Med. Bull. 40, 18–27. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071942

Medhanie, G.A., Pearl, D.L., McEwen, S.A., Guerin, M.T., Jardine, C.M., Schrock, J., LeJeune, J.T., 2017. Spatial Clustering of Escherichia coli with Reduced Susceptibility to Cefotaxime and Ciprofloxacin among Dairy Cattle Farms Relative to European Starling Night Roosts. Zoonoses Public Health 64, 204–212. https://doi.org/10.1111/zph.12296

Meena, P.R., Priyanka, P., Singh, A.P., 2023. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) reservoirs, and antibiotics resistance trends: a one-health surveillance for risk analysis from “farm-to-fork.” Lett. Appl. Microbiol. 76, ovac016. https://doi.org/10.1093/lambio/ovac016

Meguenni, N., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Corvec, M., Bounar-Kechih, S., Bakour, R., Kempf, I., 2014. First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin- and Fluoroquinolone-Resistant Avian Pathogenic Escherichia coli Clone in Algeria. Avian Dis. 59, 20–23. https://doi.org/10.1637/10804-022414-Reg.1

Mnif, B., Harhour, H., Jdidi, J., Mahjoubi, F., Genel, N., Arlet, G., Hammami, A., 2013a. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. BMC Microbiol. 13, 147. https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-147

Mnif, B., Ktari, S., Chaari, A., Medhioub, F., Rhimi, F., Bouaziz, M., Hammami, A., 2013b. Nosocomial dissemination of Providencia stuartii isolates carrying bla OXA-48, bla PER-1, bla CMY-4 and qnrA6 in a Tunisian hospital. J. Antimicrob. Chemother. 68, 329–332. https://doi.org/10.1093/jac/dks386

Mohamed Al-Agamy, M.H., El-Din Ashour, M.S., Wiegand, I., 2006. First description of CTX-M β-lactamase-producing clinical Escherichia coli isolates from Egypt. Int. J. Antimicrob. Agents 27, 545–548. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.007

Mohan, V., Stevenson, M., Marshall, J., Fearnhead, P., Holland, B.R., Hotter, G., French, N.P., 2013. Campylobacter jejuni colonization and population structure in urban populations of ducks and starlings in New Zealand. MicrobiologyOpen 2, 659–673. https://doi.org/10.1002/mbo3.102

Mojica, M.F., Rossi, M.-A., Vila, A.J., Bonomo, R.A., 2022. The urgent need for metallo-β-lactamase inhibitors: an unattended global threat. Lancet Infect. Dis. 22, e28–e34. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30868-9

Morakchi, H., Loucif, L., Gacemi-Kirane, D., Rolain, J.-M., 2017. Molecular characterisation of carbapenemases in urban pigeon droppings in France and Algeria. J. Glob. Antimicrob. Resist. 9, 103–110. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.02.010

Mulchandani, R., Wang, Y., Gilbert, M., Boeckel, T.P.V., 2023. Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. PLOS Glob. Public Health 3, e0001305. https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0001305

Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol. Spectr. 4, 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016–2015. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015

Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G.R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Chipeta, M.G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B.H.K., Kumaran, E.A.P., McManigal, B., Achalapong, S., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Babin, F.-X., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Berkley, J.A., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalheiro, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Donatien, R.C., Cook, A.J., Cooper, B., Cressey, T.R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N.P.J., Luca, M.D., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S.J., Bich, T.D., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garcia, C., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A.Z., Greer, R.C., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S.I., Holm, M., Hopkins, S., Hsia, Y., Iregbu, K.C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Jenney, A.W.J., Khorana, M., Khusuwan, S., Kissoon, N., Kobeissi, E., Kostyanev, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H.H., Lim, C., Lim, K., Limmathurotsakul, D., Loftus, M.J., Lunn, M., Ma, J., Manoharan, A., Marks, F., May, J., Mayxay, M., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Musila, L.A., Mussi-Pinhata, M.M., Naidu, R.N., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C.W., Ochoa, T.J., Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Ounchanum, P., Pak, G.D., Paredes, J.L., Peleg, A.Y., Perrone, C., Phe, T., Phommasone, K., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Rattanavong, S., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J.V., Roca, A., Rosenthal, V.D., Rudd, K.E., Russell, N., Sader, H.S., Saengchan, W., Schnall, J., Scott, J.A.G., Seekaew, S., Sharland, M., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Simpson, A.J., Steenkeste, N., Stewardson, A.J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Tigoi, C., Turner, C., Turner, P., Doorn, H.R. van, Velaphi, S., Vongpradith, A., Vongsouvath, M., Vu, H., Walsh, T., Walson, J.L., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wannapinij, P., Wozniak, T., Sharma, T.E.M.W.Y., Yu, K.C., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., Naghavi, M., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet 399, 629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R.A., Dabos, M.L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., Iorga, B.I., 2017. Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 32, 917–919. https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235

Nabil, N.M., Erfan, A.M., Tawakol, M.M., Haggag, N.M., Naguib, M.M., Samy, A., 2020. Wild Birds in Live Birds Markets: Potential Reservoirs of Enzootic Avian Influenza Viruses and Antimicrobial Resistant Enterobacteriaceae in Northern Egypt. Pathogens 9, 196. https://doi.org/10.3390/pathogens9030196

Nang, S.C., Li, J., Velkov, T., 2019. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. Crit. Rev. Microbiol. 45, 131–161. https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1492902

Ncir, S., Lupo, A., Drapeau, A., Châtre, P., Souguir, M., Azaiez, S., Madec, J.-Y., Mansour, W., Haenni, M., 2022. Back to the Origin: blaOXA-204 and blaNDM-1 Genes in

Shewanella spp. from a Tunisian River. Microbiol. Spectr. 10, e0160522. https://doi.org/10.1128/spectrum.01605-22

Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., Timinouni, M., 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum β-lactamases in Klebsiella-Enterobacter-Serratia group bacteria, in Algeria. Med. Mal. Infect. 42, 20–29. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2011.10.001

Nhung, N.T., Chansiripornchai, N., Carrique-Mas, J.J., 2017. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. Front. Vet. Sci. 4, 126. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126

Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C.A., Hallet, B., 2015. The Tn3-family of Replicative Transposons. Microbiol. Spectr. 3. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0060-2014

Niero, G., Bortolaia, V., Vanni, M., Intorre, L., Guardabassi, L., Piccirillo, A., 2018. High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical Escherichia coli from commercial poultry flocks in Italy. Vet. Microbiol. 216, 93–98. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.012

Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., Livermore, D.M., 2011. The emerging NDM carbapenemases. Trends Microbiol. 19, 588–595. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005

Novais, Â., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galán, J.-C., Peixe, L., Carattoli, A., Baquero, F., Coque, T.M., 2006. Dissemination and Persistence of blaCTX-M-9 Are Linked to Class 1 Integrons Containing CR1 Associated with Defective Transposon Derivatives from Tn402 Located in Early Antibiotic Resistance Plasmids of IncHI2, IncP1-α, and IncFI Groups. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2741–2750. https://doi.org/10.1128/AAC.00274-06

Nüesch-Inderbinen, M., Tresch, S., Zurfluh, K., Cernela, N., Biggel, M., Stephan, R., 2022. Finding of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacterales in wild game meat originating from several European countries: predominance of Moellerella wisconsensis producing CTX-M-1, November 2021. Eurosurveillance 27, 2200343. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.49.2200343

Ocejo, M., Tello, M., Oporto, B., Lavín, J.L., Hurtado, A., 2020. Draft Genome Sequence of Escherichia marmotae E690, Isolated from Beef Cattle. Microbiol. Resour. Announc. 9, e00739-20. https://doi.org/10.1128/MRA.00739-20

Olsen, R.H., Bisgaard, M., Löhren, U., Robineau, B., Christensen, H., 2014. Extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. Avian Pathol. 43, 199–208. https://doi.org/10.1080/03079457.2014.907866

OMSA, 2023. Septième Rapport annuel sur les agents antimicrobiens destinés à être utilisés chez les animaux [WWW Document]. OMSA - Organ. Mond. Santé Anim. URL https://www.woah.org/fr/document/septieme-rapport-annuel-sur-les-agents-antimicrobiens-destines-a-etre-utilises-chez-les-animaux/ (accessed 9.21.23).

O'Neill, J., 2014. Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. London.

Oteo, J., Cercenado, E., Fernández-Romero, S., Saéz, D., Padilla, B., Zamora, E., Cuevas, O., Bautista, V., Campos, J., 2012. Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Escherichia coli as a Cause of Pediatric Infections: Report of a Neonatal Intensive Care Unit Outbreak Due to a CTX-M-14-Producing Strain. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 54–58. https://doi.org/10.1128/AAC.05103-11

Palmeira, J.D., Cunha, M.V., Carvalho, J., Ferreira, H., Fonseca, C., Torres, R.T., 2021a. Emergence and Spread of Cephalosporinases in Wildlife: A Review. Anim. Open Access J. MDPI 11, 1765. https://doi.org/10.3390/ani11061765

Palmeira, J.D., Ferreira, H.M.N., 2020. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production – a threat around the world. Heliyon 6. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03206

Palmgren, H., McCafferty, D., Aspán, A., Broman, T., Sellin, M., Wollin, R., Bergström, S., Olsen, B., 2000. Salmonella in sub-Antarctica: low heterogeneity in Salmonella serotypes in South Georgian seals and birds. Epidemiol. Infect. 125, 257–262. https://doi.org/10.1017/s0950268899004586

Panel (OHHLEP), O.H.H.-L.E., Adisasmito, W.B., Almuhairi, S., Behravesh, C.B., Bilivogui, P., Bukachi, S.A., Casas, N., Becerra, N.C., Charron, D.F., Chaudhary, A., Zanella, J.R.C., Cunningham, A.A., Dar, O., Debnath, N., Dungu, B., Farag, E., Gao, G.F., Hayman, D.T.S., Khaitsa, M., Koopmans, M.P.G., Machalaba, C., Mackenzie, J.S., Markotter, W., Mettenleiter, T.C., Morand, S., Smolenskiy, V., Zhou, L., 2022. One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. PLOS Pathog. 18, e1010537. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010537

Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018a. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 31, e00088-17. https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17

Pascual, V., Alonso, N., Simó, M., Ortiz, G., Garcia, M.C., Xercavins, M., Rivera, A., Morera, M.A., Miró, E., Espejo, E., Navarro, F., Gurguí, M., Pérez, J., Rodríguez-Carballeira, M., Garau, J., Calbo, E., 2016. Bloodstream infections caused by Escherichia coli producing AmpC β-lactamases: epidemiology and clinical features. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. 35, 1997–2003. https://doi.org/10.1007/s10096-016-2752-3

Peirano, G., Pitout, J.D.D., 2019a. Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. Drugs 79, 1529–1541. https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3

Pérez-Etayo, L., González, D., Leiva, J., Vitas, A.I., 2020. Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Different Aquatic Environments in the North of Spain and South of France. Microorganisms 8, 1425. https://doi.org/10.3390/microorganisms8091425

Perez-Palacios, P., Girlich, D., Soraa, N., Lamrani, A., Maoulainine, F.M.R., Bennaoui, F., Amri, H., El idrissi, N.S., Bouskraoui, M., Birer, A., Jousset, A.B., Oueslati, S., Raymond, J., Naas, T., 2023. Multidrug-resistant Enterobacterales responsible for septicaemia in a neonatal intensive care unit in Morocco. J. Glob. Antimicrob. Resist. 33, 208–217. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.02.011

Philippon, A., Arlet, G., Labia, R., Iorga, B.I., n.d. Class C β-Lactamases: Molecular Characteristics. Clin. Microbiol. Rev. 35, e00150-21. https://doi.org/10.1128/cmr.00150-21

Philippon, A., Ben Redjeb, S., Fournier, G., Ben Hassen, A., 1989. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases. Infection 17, 347–354. https://doi.org/10.1007/BF01650727

Phillips, J.N., Berlow, M., Derryberry, E.P., 2018. The Effects of Landscape Urbanization on the Gut Microbiome: An Exploration Into the Gut of Urban and Rural White-Crowned Sparrows. Front. Ecol. Evol. 6.

Plaza-Rodríguez, C., Alt, K., Grobbel, M., Hammerl, J.A., Irrgang, A., Szabo, I., Stingl, K., Schuh, E., Wiehle, L., Pfefferkorn, B., Naumann, S., Kaesbohrer, A., Tenhagen, B.-A., 2021. Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany? Front. Vet. Sci. 7, 627821. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.627821

Poirel, L., de la Rosa, J.-M.O., Richard, A., Aires-de-Sousa, M., Nordmann, P., 2019. CTX-M-33 Is a CTX-M-15 Derivative Conferring Reduced Susceptibility to Carbapenems. Antimicrob. Agents Chemother. 63, e01515-19. https://doi.org/10.1128/AAC.01515-19

Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann, P., 2004. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 15–22. https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004

Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin. Microbiol. Rev. 30, 557–596. https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16

Poirel, L., Kämpfer, P., Nordmann, P., 2002. Chromosome-Encoded Ambler Class A β-Lactamase of Kluyvera georgiana, a Probable Progenitor of a Subgroup of CTX-M Extended-Spectrum β-Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 4038–4040. https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.4038-4040.2002

Poirel, L., Lartigue, M.-F., Decousser, J.-W., Nordmann, P., 2005a. ISEcp1B-Mediated Transposition of blaCTX-M in Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 447–450. https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.447-450.2005

Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S., 2018. Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. Microbiol. Spectr. 6. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017

Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2008. Genetic support of extended-spectrum β-lactamases. Clin. Microbiol. Infect. 14, 75–81. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01865.x

Poirel, L., Potron, A., De La Cuesta, C., Cleary, T., Nordmann, P., Munoz-Price, L.S., 2012a. Wild Coastline Birds as Reservoirs of Broad-Spectrum-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Miami Beach, Florida. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 2756–2758. https://doi.org/10.1128/AAC.05982-11

Poirel, L., Potron, A., Nordmann, P., 2012b. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J. Antimicrob. Chemother. 67, 1597–1606. https://doi.org/10.1093/jac/dks121

Puja, H., Comment, G., Chassagne, S., Plésiat, P., Jeannot, K., 2020. Coordinate overexpression of two RND efflux systems, ParXY and TtgABC, is responsible for multidrug resistance in Pseudomonas putida. Environ. Microbiol. 22, 5222–5231. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15200

Rahman, M.H., Sakamoto, K.Q., Nonaka, L., Suzuki, S., 2008. Occurrence and diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) in enteric bacteria of Antarctic Adelie penguins. J. Antimicrob. Chemother. 62, 627–628. https://doi.org/10.1093/jac/dkn209

Ramey, A.M., Ahlstrom, C.A., 2019. ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA IN WILDLIFE: PERSPECTIVES ON TRENDS, ACQUISITION AND DISSEMINATION, DATA GAPS, AND FUTURE DIRECTIONS. J. Wildl. Dis. 56, 1–15. https://doi.org/10.7589/2019-04-099

Ramey, A.M., Hernandez, J., Tyrlöv, V., Uher-Koch, B.D., Schmutz, J.A., Atterby, C., Järhult, J.D., Bonnedahl, J., 2018. Antibiotic-Resistant Escherichia coli in Migratory Birds Inhabiting Remote Alaska. EcoHealth 15, 72–81. https://doi.org/10.1007/s10393-017-1302-5

Ramsay, J.P., Hynes, M.F., Sullivan, J.T., Ronson, C.W., 2017. Symbiosis Islands☆, in: Reference Module in Life Sciences. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.07223-X

Retamal, P., Llanos-Soto, S., Salas, L.M., López, J., Vianna, J., Hernández, J., Medina-Vogel, G., Castañeda, F., Fresno, M., González-Acuña, D., 2017. Isolation of drug-resistant Salmonella enterica serovar enteritidis strains in gentoo penguins from Antarctica. Polar Biol. 40, 2531–2536. https://doi.org/10.1007/s00300-017-2163-7

Ribeiro, T.G., Novais, Â., Rodrigues, C., Nascimento, R., Freitas, F., Machado, E., Peixe, L., 2019. Dynamics of clonal and plasmid backgrounds of Enterobacteriaceae producing acquired AmpC in Portuguese clinical settings over time. Int. J. Antimicrob. Agents 53, 650–656. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.03.013

Rivadeneira, P., Hilson, C., Justice-Allen, A., Jay-Russell, M., 2016. Pathogen Risks Related to the Movement of Birds Frequenting Livestock and Fresh Produce Growing Areas in the Southwestern U.S. Proc. Vertebr. Pest Conf. 27. https://doi.org/10.5070/V427110583

Robin, F., Beyrouthy, R., Bonacorsi, S., Aissa, N., Bret, L., Brieu, N., Cattoir, V., Chapuis, A., Chardon, H., Degand, N., Doucet-Populaire, F., Dubois, V., Fortineau, N., Grillon, A., Lanotte, P., Leyssene, D., Patry, I., Podglajen, I., Recule, C., Ros, A., Colomb-Cotinat, M., Ponties, V., Ploy, M.C., Bonnet, R., 2017. Inventory of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study. Antimicrob. Agents Chemother. 61, e01911-16. https://doi.org/10.1128/AAC.01911-16

Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R.C., San Millán, Á., 2021a. Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. Nat. Rev. Microbiol. 19, 347–359. https://doi.org/10.1038/s41579-020-00497-1

Rodríguez-Guerrero, E., Callejas-Rodelas, J.C., Navarro-Marí, J.M., Gutiérrez-Fernández, J., 2022. Systematic Review of Plasmid AmpC Type Resistances in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae and Preliminary Proposal of a Simplified Screening Method for ampC. Microorganisms 10, 611. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030611

Rodriguez-Villalobos, H., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Deplano, A., Montesinos, I., de Mendonça, R., Jans, B., Glupczynski, Y., 2011. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 66, 37–47. https://doi.org/10.1093/jac/dkq388

Rohde, A.M., Zweigner, J., Wiese-Posselt, M., Schwab, F., Behnke, M., Kola, A., Schröder, W., Peter, S., Tacconelli, E., Wille, T., Feihl, S., Querbach, C., Gebhardt, F., Gölz, H., Schneider, C., Mischnik, A., Vehreschild, M.J.G.T., Seifert, H., Kern, W.V., Gastmeier, P., Hamprecht, A., 2020. Prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales colonization on hospital admission and ESBL genotype-specific risk factors: a cross-sectional study in six German university hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 75, 1631–1638. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa052

Rose, E., Nagel, P., Haag-Wackernagel, D., 2006. Spatio-temporal use of the urban habitat by feral pigeons (Columba livia). Behav. Ecol. Sociobiol. 60, 242–254. https://doi.org/10.1007/s00265-006-0162-8

Rozwadowski, M., Gawel, D., 2022. Molecular Factors and Mechanisms Driving Multidrug Resistance in Uropathogenic Escherichia coli—An Update. Genes 13, 1397. https://doi.org/10.3390/genes13081397

Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D.J., Hordijk, J., 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 73, 1121–1137. https://doi.org/10.1093/jac/dkx488

Ruzauskas, M., Vaskeviciute, L., 2016. Detection of the mcr-1 gene in Escherichia coli prevalent in the migratory bird species Larus argentatus. J. Antimicrob. Chemother. 71, 2333–2334. https://doi.org/10.1093/jac/dkw245

Saidani, M., Messadi, L., Soudani, A., Daaloul-Jedidi, M., Châtre, P., Ben Chehida, F., Mamlouk, A., Mahjoub, W., Madec, J.-Y., Haenni, M., 2018. Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Clinical Bovine Mastitis in Tunisia. Microb. Drug Resist. 24, 1242–1248. https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0049

Sakaguchi, K., Tanabe, M., Takizawa, S., Kasahara, S., Denda, T., Koide, S., Hayashi, W., Nagano, Y., Nagano, N., 2023. Zoonotic potential and antimicrobial resistance of Escherichia spp. in urban crows in Japan-first detection of E. marmotae and E. ruysiae. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 100, 102040. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102040

Salgado-Caxito, M., Benavides, J.A., Adell, A.D., Paes, A.C., Moreno-Switt, A.I., 2021. Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β-lactamase producing-Escherichia coli in dogs and cats – A scoping review and meta-analysis. One Health 12, 100236. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100236

Saliu, E.-M., Vahjen, W., Zentek, J., 2017. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. Anim. Health Res. Rev. 18, 46–57. https://doi.org/10.1017/s1466252317000020

Sallem, N., Hammami, A., Mnif, B., 2022. Trends in human intestinal carriage of ESBL- and carbapenemase-producing Enterobacterales among food handlers in Tunisia: emergence of C1-M27-ST131 subclades, blaOXA-48 and blaNDM. J. Antimicrob. Chemother. 77, 2142–2152. https://doi.org/10.1093/jac/dkac167

Sallem, R.B., Gharsa, H., Slama, K.B., Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Porres-Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., Sáenz, Y., Boudabous, A., Torres, C., 2013. First Detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 Resistance Mechanisms in Fecal Escherichia coli

Isolates from Healthy Pets in Tunisia. Vector-Borne Zoonotic Dis. 13, 98–102. https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1047

Sanad, Y.M., Closs, G., Kumar, A., LeJeune, J.T., Rajashekara, G., 2013. Molecular Epidemiology and Public Health Relevance of Campylobacter Isolated from Dairy Cattle and European Starlings in Ohio, USA. Foodborne Pathog. Dis. 10, 229–236. https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1293

Sato, G., Oka, C., Asagi, M., Ishiguro, N., 1978. Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in Escherichia coli isolated from domestic and feral pigeons and crows. Zentralblatt Bakteriol. Parasitenkd. Infekt. Hyg. Erste Abt. Orig. Reihe Med. Mikrobiol. Parasitol. 241, 407–417.

Sawa, T., Kooguchi, K., Moriyama, K., 2020. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. J. Intensive Care 8, 13. https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6

Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A., 2005. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. Clin. Orthop. 3–6. https://doi.org/10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe

Schwabe, C.W., 1964. Veterinary medicine and human health. Baltimore, Williams & Wilkins.

Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M.A., Beyvers, S., Blom, J., Goesmann, A., 2021. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. Microb. Genomics 7, 000685. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685

Sekizuka, T., Matsui, M., Yamane, K., Takeuchi, F., Ohnishi, M., Hishinuma, A., Arakawa, Y., Kuroda, M., 2011. Complete Sequencing of the bla NDM-1-Positive IncA/C Plasmid from Escherichia coli ST38 Isolate Suggests a Possible Origin from Plant Pathogens. PLoS ONE 6, e25334. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025334

Seo, K.-W., Do, K.-H., Shin, M.-K., Lee, Woo-Kon, Lee, Wan-Kyu, 2023. Comparative genetic characterization of CMY-2-type beta-lactamase producing pathogenic Escherichia coli isolated from humans and pigs suffering from diarrhea in Korea. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 22, 7. https://doi.org/10.1186/s12941-023-00559-1

Sghaier, S., Abbassi, M.S., Pascual, A., Serrano, L., Díaz-De-Alba, P., Said, M.B., Hassen, B., Ibrahim, C., Hassen, A., López-Cerero, L., 2019. Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae from animal origin and wastewater in Tunisia: first detection of O25b-B23-CTX-M-27-ST131 Escherichia coli and CTX-M-15/OXA-204-producing Citrobacter freundii from wastewater. J. Glob. Antimicrob. Resist. 17, 189–194. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.002

Shapiro, M.D., Domyan, E.T., 2013. Domestic pigeons. Curr. Biol. CB 23, R302–R303. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.063

Shen, Z., Tang, C.M., Liu, G.-Y., 2022. Towards a better understanding of antimicrobial resistance dissemination: what can be learnt from studying model conjugative plasmids? Mil. Med. Res. 9. https://doi.org/10.1186/s40779-021-00362-z

Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y., Arakawa, Y., 2004. Escherichia coli producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. Emerg. Infect. Dis. 10, 69–75. https://doi.org/10.3201/eid1001.030219

Simões, R.R., Poirel, L., Da Costa, P.M., Nordmann, P., 2010. Seagulls and Beaches as Reservoirs for Multidrug-Resistant Escherichia coli. Emerg. Infect. Dis. 16, 110–112. https://doi.org/10.3201/eid1601.090896

Sivertsen, A., Dyrhovden, R., Tellevik, M.G., Bruvold, T.S., Nybakken, E., Skutlaberg, D.H., Skarstein, I., Kommedal, Ø., 2022. Escherichia marmotae—a Human Pathogen Easily Misidentified as Escherichia coli. Microbiol. Spectr. 10, e02035-21. https://doi.org/10.1128/spectrum.02035-21

Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., Kahlmeter, G., Olsen, B., 2008. Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria into the Arctic. Emerg. Infect. Dis. 14, 70–72. https://doi.org/10.3201/eid1401.070704

Skov, M.N., Madsen, J.J., Rahbek, C., Lodal, J., Jespersen, J.B., Jørgensen, J.C., Dietz, H.H., Chriél, M., Baggesen, D.L., 2008. Transmission of Salmonella between wildlife and meat-production animals in Denmark. J. Appl. Microbiol. 105, 1558–1568. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03914.x

Slama, K.B., Jouini, A., Sallem, R.B., Somalo, S., Sáenz, Y., Estepa, V., Boudabous, A., Torres, C., 2010. Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant Escherichia coli isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. Int. J. Food Microbiol. 137, 281–286. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.003

Slattery, S., Tony Pembroke, J., Murnane, J.G., Ryan, M.P., 2020. Isolation, nucleotide sequencing and genomic comparison of a Novel SXT/R391 ICE mobile genetic element isolated from a municipal wastewater environment. Sci. Rep. 10, 8716. https://doi.org/10.1038/s41598-020-65216-5

Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal Escherichia coli Isolates in Belgian broiler farms. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 1238–1243. https://doi.org/10.1128/AAC.01285-07

Smith, O.M., Snyder, W.E., Owen, J.P., 2020. Are we overestimating risk of enteric pathogen spillover from wild birds to humans? Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 95, 652–679. https://doi.org/10.1111/brv.12581

Smith, R.A., M'ikanatha, N.M., Read, A.F., 2015. Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. Health Commun. 30, 309–314. https://doi.org/10.1080/10410236.2014.943634

Sola, M., Mani, Y., Saras, E., Drapeau, A., Grami, R., Aouni, M., Madec, J.-Y., Haenni, M., Mansour, W., 2022a. Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacterales from Tunisian Seafood. Microorganisms 10, 1364. https://doi.org/10.3390/microorganisms10071364

Soler, N., Forterre, P., 2020. Vesiduction: the fourth way of HGT. Environ. Microbiol. 22, 2457–2460. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15056

Sougakoff, W., Goussard, S., Gerbaud, G., Courvalin, P., 1988. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. Rev. Infect. Dis. 10, 879–884. https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.879

Souna, D., Drissi, M., Almahmoud, I., Maurin, M., 2022. Enterobacter cloacae Complex and CTX-M Extended-Spectrum β-Lactamases in Algeria. Microb. Drug Resist. 28, 346–354. https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0535

Stefani, S., Giovanelli, I., Anacarso, I., Condò, C., Messi, P., de Niederhäusern, S., Bondi, M., Iseppi, R., Sabia, C., 2014. Prevalence and characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in food-producing animals in Northern Italy. New Microbiol. 37, 551–555.

Storberg, V., 2014. ESBL-producing Enterobacteriaceae in Africa – a non-systematic literature review of research published 2008–2012. Infect. Ecol. Epidemiol. 4, 10.3402/iee.v4.20342. https://doi.org/10.3402/iee.v4.20342

STPI, n.d. Résistance bactérienne [WWW Document]. URL https://www.infectiologie.org.tn/resistance.php (accessed 9.16.23).

Suárez-Pérez, A., Corbera, J.A., González-Martín, M., Tejedor-Junco, M.T., 2021. Multidrug-Resistant Phenotypes of Escherichia coli Isolates in Wild Canarian Egyptian Vultures (Neophron percnopterus majorensis). Anim. Open Access J. MDPI 11, 1692. https://doi.org/10.3390/ani11061692

Sun, F., Chen, J., Liu, K., Tang, M., Yang, Y., 2022. The avian gut microbiota: Diversity, influencing factors, and future directions. Front. Microbiol. 13, 934272. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.934272

Swift, B.M.C., Bennett, M., Waller, K., Dodd, C., Murray, A., Gomes, R.L., Humphreys, B., Hobman, J.L., Jones, M.A., Whitlock, S.E., Mitchell, L.J., Lennon, R.J., Arnold, K.E., 2019. Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. Sci. Total Environ. 649, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.180

Tacconelli, E., 2017. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., WHO Pathogens Priority List Working Group, 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect. Dis. 18, 318–327. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3

Tafoukt, R., Touati, A., Leangapichart, T., Bakour, S., Rolain, J.-M., 2017. Characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae isolated from river water in Algeria. Water Res. 120, 185–189. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.073

Tang, K.W.K., Millar, B.C., Moore, J.E., 2023. Antimicrobial Resistance (AMR). Br. J. Biomed. Sci. 80, 11387. https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387

Tarabai, H., Krejci, S., Karyakin, I., Bitar, I., Literak, I., Dolejska, M., 2023. Clinically relevant antibiotic resistance in Escherichia coli from black kites in southwestern Siberia: a genetic and phenotypic investigation. mSphere 8, e0009923. https://doi.org/10.1128/msphere.00099-23

Tausova, D., Dolejska, M., Cizek, A., Hanusova, L., Hrusakova, J., Svoboda, O., Camlik, G., Literak, I., 2012. Escherichia coli with extended-spectrum β-lactamase and plasmid-

mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. J. Antimicrob. Chemother. 67, 1103–1107. https://doi.org/10.1093/jac/dks017

Tawfik, A.F., Shibl, A.M., Aljohi, M.A., Altammami, M.A., Al-Agamy, M.H., 2012. Distribution of Ambler class A, B and D β-lactamases among Pseudomonas aeruginosa isolates. Burns J. Int. Soc. Burn Inj. 38, 855–860. https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.01.005

Tekele, S.G., Teklu, D.S., Tullu, K.D., Birru, S.K., Legese, M.H., 2020. Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC beta-lactamases producing gram negative bacilli isolated from clinical specimens at International Clinical Laboratories, Addis Ababa, Ethiopia. PLoS ONE 15, e0241984. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241984

Tello, M., Ocejo, M., Oporto, B., Hurtado, A., 2020. Prevalence of Cefotaxime-Resistant Escherichia coli Isolates from Healthy Cattle and Sheep in Northern Spain: Phenotypic and Genome-Based Characterization of Antimicrobial Susceptibility. Appl. Environ. Microbiol. 86, e00742-20. https://doi.org/10.1128/AEM.00742-20

Tello, M., Ocejo, M., Oporto, B., Lavín, J.L., Hurtado, A., 2022. Within-farm dynamics of ESBL-producing Escherichia coli in dairy cattle: Resistance profiles and molecular characterization by long-read whole-genome sequencing. Front. Microbiol. 13, 936843. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.936843

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal Escherichia coli. Nat. Rev. Microbiol. 8, 207–217. https://doi.org/10.1038/nrmicro2298

Teyssier, A., Matthysen, E., Hudin, N.S., de Neve, L., White, J., Lens, L., 2020. Diet contributes to urban-induced alterations in gut microbiota: experimental evidence from a wild passerine. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 287, 20192182. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2182

The Eurasian African Bird Migration Atlas, 2022. European starlings Sturnus vulgaris [WWW Document]. URL https://migrationatlas.org/node/1834#top (accessed 9.26.23).

Thomson, N.M., Gilroy, R., Getino, M., Foster-Nyarko, E., van Vliet, A.H.M., La Ragione, R.M., Pallen, M.J., 2022. Remarkable genomic diversity among Escherichia isolates recovered from healthy chickens. PeerJ 10, e12935. https://doi.org/10.7717/peerj.12935

Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R., 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 70, 296–316. https://doi.org/10.1128/MMBR.00048-05

Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J., 2019a. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. J. Mol. Biol. 431, 3472–3500. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002

Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J., 2019b. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. J. Mol. Biol. 431, 3472–3500. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002

Toombs-Ruane, L.J., Benschop, J., French, N.P., Biggs, P.J., Midwinter, A.C., Marshall, J.C., Chan, M., Drinković, D., Fayaz, A., Baker, M.G., Douwes, J., Roberts, M.G., Burgess, S.A., 2020. Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and AmpC Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli Strains from Humans and Pets in the Same

Households. Appl. Environ. Microbiol. 86, e01613-20. https://doi.org/10.1128/AEM.01613-20

Torres, R.T., Carvalho, J., Cunha, M.V., Serrano, E., Palmeira, J.D., Fonseca, C., 2020. Temporal and geographical research trends of antimicrobial resistance in wildlife – A bibliometric analysis. One Health 11, 100198. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100198

Toureche, K., Oudjhih, M., Chiboub, B., 2020. Evaluation de la surveillance du programme d'éradication de la poliomyélite dans la wilaya de Batna 2005-2019 110.

Tseng, C.-H., Liu, C.-W., Liu, P.-Y., 2023. Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL) Producing Bacteria in Animals. Antibiotics 12, 661. https://doi.org/10.3390/antibiotics12040661

Ude, J., Tripathi, V., Buyck, J.M., Söderholm, S., Cunrath, O., Fanous, J., Claudi, B., Egli, A., Schleberger, C., Hiller, S., Bumann, D., 2021. Outer membrane permeability: Antimicrobials and diverse nutrients bypass porins in Pseudomonas aeruginosa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 118, e2107644118. https://doi.org/10.1073/pnas.2107644118

Uluseker, C., Kaster, K.M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., Pala-Ozkok, I., 2021. A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. Front. Microbiol. 12, 717809. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809

Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 5649–5654. https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112

Van Boeckel, T.P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N.G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., Laxminarayan, R., 2019. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. Science 365, eaaw1944. https://doi.org/10.1126/science.aaw1944

van den Bunt, G., Fluit, A.C., Spaninks, M.P., Timmerman, A.J., Geurts, Y., Kant, A., Scharringa, J., Mevius, D., Wagenaar, J.A., Bonten, M.J.M., van Pelt, W., Hordijk, J., 2020. Faecal carriage, risk factors, acquisition and persistence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in dogs and cats and co-carriage with humans belonging to the same household. J. Antimicrob. Chemother. 75, 342–350. https://doi.org/10.1093/jac/dkz462

Varani, A., He, S., Siguier, P., Ross, K., Chandler, M., 2021. The IS6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS26. Mob. DNA 12, 11. https://doi.org/10.1186/s13100-021-00239-x

Ventola, C.L., 2015. The Antibiotic Resistance Crisis. Pharm. Ther. 40, 277–283.

Vergara, A., Pitart, C., Montalvo, T., Roca, I., Sabaté, S., Hurtado, J.C., Planell, R., Marco, F., Ramírez, B., Peracho, V., de Simón, M., Vila, J., 2017. Prevalence of Extended-Spectrum-β-Lactamase- and/or Carbapenemase-Producing Escherichia coli Isolated from Yellow-Legged Gulls from Barcelona, Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 61, e02071-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02071-16

Villa, L., Guerra, B., Schmoger, S., Fischer, J., Helmuth, R., Zong, Z., García-Fernández, A., Carattoli, A., 2015. IncA/C Plasmid Carrying blaNDM-1, blaCMY-16, and fosA3 in a Salmonella enterica Serovar Corvallis Strain Isolated from a Migratory Wild Bird in Germany. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6597–6600. https://doi.org/10.1128/AAC.00944-15

Vittecoq, M., Laurens, C., Brazier, L., Durand, P., Elguero, E., Arnal, A., Thomas, F., Aberkane, S., Renaud, N., Prugnolle, F., Solassol, J., Jean-Pierre, H., Godreuil, S., Renaud, F., 2017. VIM-1 carbapenemase-producing Escherichia coli in gulls from southern France. Ecol. Evol. 7, 1224–1232. https://doi.org/10.1002/ece3.2707

Voets, G.M., Platteel, T.N., Fluit, A.C., Scharringa, J., Schapendonk, C.M., Stuart, J.C., Bonten, M.J.M., Hall, M.A.L., 2012. Population Distribution of Beta-Lactamase Conferring Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Human Clinical Enterobacteriaceae in The Netherlands. PLoS ONE 7, e52102. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052102

Waite, D.W., Taylor, M.W., 2014. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. Front. Microbiol. 5, 223. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00223

Waksman, S.A., 1947. What is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? Mycologia 39, 565–569. https://doi.org/10.1080/00275514.1947.12017635

Wall, S., 2019. Prevention of antibiotic resistance – an epidemiological scoping review to identify research categories and knowledge gaps. Glob. Health Action 12, 1756191. https://doi.org/10.1080/16549716.2020.1756191

Wang, J., Ma, Z.-B., Zeng, Z.-L., Yang, X.-W., Huang, Y., Liu, J.-H., 2017a. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. Zool. Res. 38, 55–80. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003

Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., 1991. Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 147–151.

Weston, N., Sharma, P., Ricci, V., Piddock, L.J.V., 2018. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. Res. Microbiol., Special issue on Bacterial multidrug efflux pumps 169, 425–431. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.10.005

WHO, 2022. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS): 2022 report. www.who.int.

WHO, 2021a. Antimicrobial resistance [WWW Document]. URL https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance (accessed 8.4.23).

WHO, 2021b. Tripartite and UNEP support OHHLEP's definition of "One Health" [WWW Document]. World Health Organ. URL https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-and-unep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health (accessed 5.18.23).

WHO, ECDC, 2023. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023–2021 data. data [WWW Document]. URL https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2023-2021-data

Wildlife Conservation Society, 2004. One World One Health Brazil Meeting 22 October 2009 [WWW Document]. One World One Health. URL http://www.oneworldonehealth.org/index.html (accessed 8.8.23).

Wong, J.L.C., Romano, M., Kerry, L.E., Kwong, H.-S., Low, W.-W., Brett, S.J., Clements, A., Beis, K., Frankel, G., 2019. OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 Klebsiella pneumoniae in vivo. Nat. Commun. 10, 3957. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11756-y

World Health Organization, 2021. WHO integrated global surveillance on ESBL-producing E. coli using a “One Health” approach: implementation and opportunities [WWW Document]. URL https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240021402 (accessed 10.14.23).

World Health Organization, 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization, Geneva.

Worthington, R.J., Melander, C., 2013. Overcoming Resistance to β-Lactam Antibiotics. J. Org. Chem. 78, 4207–4213. https://doi.org/10.1021/jo400236f

Wozniak, R.A.F., Fouts, D.E., Spagnoletti, M., Colombo, M.M., Ceccarelli, D., Garriss, G., Déry, C., Burrus, V., Waldor, M.K., 2009. Comparative ICE Genomics: Insights into the Evolution of the SXT/R391 Family of ICEs. PLOS Genet. 5, e1000786. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000786

Wu, G., Day, M.J., Mafura, M.T., Nunez-Garcia, J., Fenner, J.J., Sharma, M., van Essen-Zandbergen, A., Rodríguez, I., Dierikx, C., Kadlec, K., Schink, A.-K., Wain, J., Helmuth, R., Guerra, B., Schwarz, S., Threlfall, J., Woodward, M.J., Woodford, N., Coldham, N., Mevius, D., 2013. Comparative Analysis of ESBL-Positive Escherichia coli Isolates from Animals and Humans from the UK, The Netherlands and Germany. PLoS ONE 8, e75392. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075392

Yang, X., Liu, W., Liu, Y., Wang, J., Lv, L., Chen, X., He, D., Yang, T., Hou, J., Tan, Y., Xing, L., Zeng, Z., Liu, J.-H., 2014. F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of fosA3 and blaCTX−M−55/−14/−65 in Escherichia coli from chickens in China. Front. Microbiol. 5, 688. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00688

Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C., 2001. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1151–1161. https://doi.org/10.1128/aac.45.4.1151-1161.2001

Yoneyama, H., Katsumata, R., 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 1060–1075. https://doi.org/10.1271/bbb.70.1060

Zeballos-Gross, D., Rojas-Sereno, Z., Salgado-Caxito, M., Poeta, P., Torres, C., Benavides, J.A., 2021a. The Role of Gulls as Reservoirs of Antibiotic Resistance in Aquatic Environments: A Scoping Review. Front. Microbiol. 12, 703886. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703886

Zeng, S., Luo, J., Chen, X., Huang, L., Wu, A., Zhuo, C., Li, X., 2021. Molecular Epidemiology and Characteristics of CTX-M-55 Extended-Spectrum β-Lactamase-

Producing Escherichia coli From Guangzhou, China. Front. Microbiol. 12, 730012. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730012

Zhao, W.-H., Hu, Z.-Q., 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 39, 79–101. https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460

Zhurilov, P.A., Andriyanov, P.A., Tutrina, A.I., Razheva, I.V., Liskova, E.A., Gladkova, N.A., Kashina, D.D., Yashin, I.V., Blokhin, A.A., 2023. Characterization and comparative analysis of the Escherichia marmotae M-12 isolate from bank vole (Myodes glareolus). Sci. Rep. 13, 13949. https://doi.org/10.1038/s41598-023-41223-0

Zinder, N.D., Lederberg, J., 1952. Genetic exchange in salmonella. J. Bacteriol. 64, 679–699. https://doi.org/10.1128/jb.64.5.679-699.1952

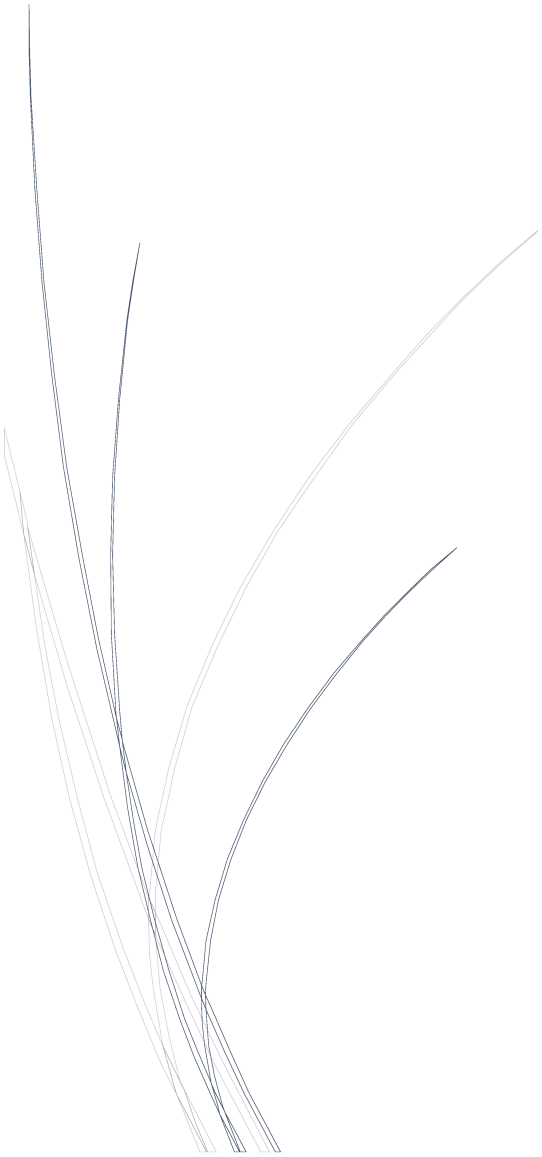
Zorgani, A., Almagatef, A., Sufya, N., Bashein, A., Tubbal, A., 2017a. Detection of CTX-M-15 Among Uropathogenic Escherichia coli Isolated from Five Major Hospitals in Tripoli, Libya. Oman Med. J. 32, 322–327. https://doi.org/10.5001/omj.2017.61

Zorgani, A., Daw, H., Sufya, N., Bashein, A., Elahmer, O., Chouchani, C., 2017b. Co-Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC β-Lactamase Activity Among Klebsiella pneumoniae and Escherichia Coli. Open Microbiol. J. 11, 195–202. https://doi.org/10.2174/1874285801711010195

Zurfluh, K., Albini, S., Mattmann, P., Kindle, P., Nüesch-Inderbinen, M., Stephan, R., Vogler, B.R., 2019. Antimicrobial resistant and extended-spectrum β-lactamase producing Escherichia coli in common wild bird species in Switzerland. MicrobiologyOpen 8, e845. https://doi.org/10.1002/mbo3.845

Zurfluh, K., Treier, A., Schmitt, K., Stephan, R., 2020. Mobile fosfomycin resistance genes in Enterobacteriaceae-An increasing threat. MicrobiologyOpen 9, e1135. https://doi.org/10.1002/mbo3.1135

Annexe



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Microbiology Spectrum

LETTER TO THE EDITOR

Back to the Origin: *bla*$_{OXA-204}$ and *bla*$_{NDM-1}$ Genes in *Shewanella* spp. from a Tunisian River

Sana Ncir,[a,b] Agnese Lupo,[a] Antoine Drapeau,[a] Pierre Châtre,[a] Meriem Souguir,[a,b] Sana Azaiez,[b] Jean-Yves Madec,[a] Wejdene Mansour,[b] Marisa Haenni[a]

[a]Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, ANSES - Université de Lyon, Lyon, France
[b]Laboratoire de Biophysique métabolique et Pharmacologie Appliquée (LR12ES02), Faculté de Médecine Ibn Al Jazzar Sousse, Sousse, Tunisia

KEYWORDS carbapenem, *Shewanella xiamenensis*, *Shewanella bicestrii*, Tunisia, NDM-1, OXA-204, IS91, PER-1

The environmental bacteria *Xanthomonas* spp. and *Shewanella* spp. are progenitors of the *bla*$_{NDM-}$ and *bla*$_{OXA-48-like}$ carbapenemase genes, respectively (1, 2). The most likely hypothesis is that these genes have been mobilized in the environment on mobile genetic elements, and subsequently transferred to Gram-negative bacteria (GNB) of clinical importance. The pathogens (primarily *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*) that acquired these carbapenemase genes then emerged as a major One Health issue and are currently reported not only in clinical settings but also in animals and the environment (3). In January 2019, two carbapenem-resistant (CP-R) *Shewanella* spp. were isolated from fresh water sampled at two different locations along the El Hammam Oued river in Sousse, Tunisia, as part of a pilot study on multidrug-resistant GNB in aquatic environments. This river collects urban treated wastewater but no hospital effluents. The two isolates resistant to ertapenem (MIC ≥32 mg/L) were whole-genome sequenced using short-read (NovaSeq-6000, Illumina) and long-read (MinION, Oxford Nanopore) technologies (all genomic sequences were deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number PRJNA830355). Genomes were assembled with Unicycler and analyzed using tools of the Center for Genomic Epidemiology (https://www.genomicepidemiology.org/).

S. xiamenensis 8A possessed a 4,959,567 bp chromosome and one nontypeable 216,160 bp plasmid (p8A) showing poor or fragmented homologies with published sequences. Except for *bla*$_{OXA-538}$, all resistance genes—conferring resistances to beta-lactams, aminoglycosides, sulfonamides, trimethoprim, rifampicin and erythromycin—were located on p8A (Fig. 1A). Specifically, p8A carried the *bla*$_{PER-1}$ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and the *bla*$_{OXA-204}$ carbapenemase genes. *bla*$_{OXA-204}$ has already been reported in one *S. xiamenensis* strain from water in Portugal (4), flanked by the peptidase C15 and *lysR* gene as intrinsically found on the *Shewanella* spp. chromosome (5). Here, the *bla*$_{OXA-204}$ gene was surrounded by an IS*Ecp1* insertion sequence and a truncated *lys*R gene, as reported in the *K. pneumoniae* KP49 isolated from a Tunisian patient (KP027886) (6). This indicates that *bla*$_{OXA-204}$ in p8A is not intrinsic but has transited through another bacterial host before being reintegrated in *S. xiamenensis* p8A via a transposition event.

Shewanella bicestrii 10B possessed a 4,717,299 bp chromosome carrying a *bla*$_{OXA-48-like}$ and the *aadA2* resistance genes. The strain additionally presented a nontypeable 160,879 bp plasmid (p10B) sharing conserved regions with the pSA70-3 and pKC-Na-R1 plasmids, respectively, isolated from *Shewanella putrefasciens* and *Shewanella algae* (Fig. 1B) (7). p10B presented genes conferring resistance to beta-lactams, aminoglycosides, sulfonamides, trimethoprim, chloramphenicol, quinolones, and rifampicin, but also to mercury and biocides. CP-R was conferred by the *bla*$_{NDM-1}$ gene; *bla*$_{NDM-1}$, together with the *bla*$_{OXA-10}$, *sul1*, and *aadA1* genes, was surrounded by two IS*91*-like that might have mediated its insertion/excision (8). A similar genetic organization was observed in pSA70-3 with only the left

Editor Daria Van Tyne, University of Pittsburgh School of Medicine

Copyright © 2022 Ncir et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Marisa Haenni, marisa.haenni@anses.fr.

The authors declare no conflict of interest.

Published 20 September 2022

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 02 September 2023 by 41.62.42.89.

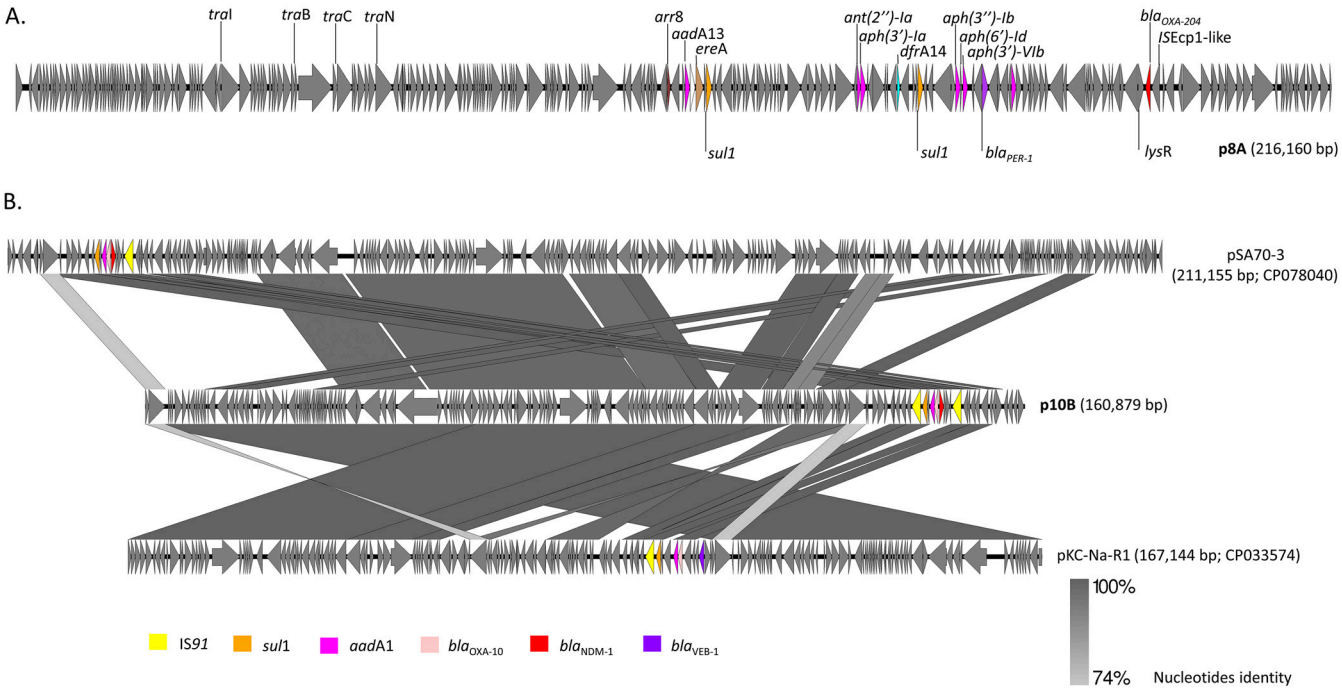


FIG 1 Schematic representation of the p8A plasmid (A). Comparative schematic representation of the p10B, pSA70-3 (CP078040), and pKC-Na-R1 (CP033574) plasmids. Genetic elements were analyzed by BLASTn and visualized using Easyfig 2.2.5_win. The window size used for BLASTn analysis was 2,000 bp.

IS*91*-like missing (7), while the element was more fragmented in pKC-Na-R1, where only the *sul1*-IS*91*-like and *aadA1*-bla_{OXA-10} genes were conserved upstream the bla_{VEB-1} ESBL gene.

Environmental bacteria are progenitors of carbapenemases (1, 2), but reacquisition of these genes by environmental bacteria is rarely reported. This study showed that the $bla_{OXA-204}$ and bla_{NDM-1} genes, which are highly prevalent in Tunisian hospital settings and effluents (9, 10), can spread back to environmental bacteria. In both cases, resistance genes moved to a *Shewanella* spp. nontypeable plasmid after IS-mediated acquisition, a mechanism that might be more efficient than plasmid transfer for bacterial genera that are not closely related.

ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by the "PHC Utique" program of the French Ministry of Foreign Affairs, the French Ministry of higher education, research, and innovation and the Tunisian Ministry of higher education and scientific research under the CMCU project number 21G0807. This work was also supported by internal funding of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES).

REFERENCES

1. Poirel L, Potron A, Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J Antimicrob Chemother 67:1597–1606. https://doi.org/10.1093/jac/dks121.
2. Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. 2011. Complete sequencing of the bla_{NDM-1}-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. PLoS One 6:e25334. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025334.
3. Dandachi I, Chaddad A, Hanna J, Matta J, Daoud Z. 2019. Understanding the epidemiology of multi-drug resistant gram-negative bacilli in the middle east using a One Health approach. Front Microbiol 10:1941. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01941.
4. Tacao M, Correia A, Henriques I. 2013. Environmental *Shewanella xiamenensis* strains that carry bla_{OXA-48} or $bla_{OXA-204}$ genes: additional proof for bla_{OXA-48}-like gene origin. Antimicrob Agents Chemother 57:6399–6400. https://doi.org/10.1128/AAC.00771-13.
5. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom K-A, Matsumura Y. 2019. The global ascendency of OXA-48-type carbapenemases. Clin Microbiol Rev 33:e00102-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19.
6. Charfi K, Mansour W, Khalifa AB, Mastouri M, Aouni M, Mammeri H. 2015. Emergence of OXA-204 beta-lactamase in Tunisia. Diagn Microbiol Infect Dis 82:314–317. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.003.
7. D'Souza AW, Potter RF, Wallace M, Shupe A, Patel S, Sun X, Gul D, Kwon JH, Andleeb S, Burnham C-AD, Dantas G. 2019. Spatiotemporal

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 02 September 2023 by 41.62.42.89.

dynamics of multidrug resistant bacteria on intensive care unit surfaces. Nat Commun 10:4569. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12563-1.
8. Chen C-J, Wu T-L, Lu P-L, Chen Y-T, Fung C-P, Chuang Y-C, Lin J-C, Siu LK. 2014. Closely related NDM-1-encoding plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. PLoS One 9:e104899. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104899.
9. Dziri O, Dziri R, Ali El Salabi A, Chouchani C. 2020. Carbapenemase producing gram-negative bacteria in Tunisia: history of thirteen years of challenge. Infect Drug Resist 13:4177–4191. https://doi.org/10.2147/IDR.S259562.
10. Nasri E, Subirats J, Sànchez-Melsió A, Mansour HB, Borrego CM, Balcázar JL. 2017. Abundance of carbapenemase genes (bla_{KPC}, bla_{NDM} and bla_{OXA-48}) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. Environ Pollut 229:371–374. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.095.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 02 September 2023 by 41.62.42.89.