



HAL
open science

Résistance aux antibiotiques chez *Mycoplasma bovis* : mécanismes moléculaires et évolution en France

Dima Khalil

► **To cite this version:**

Dima Khalil. Résistance aux antibiotiques chez *Mycoplasma bovis* : mécanismes moléculaires et évolution en France. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1238 . tel-01447763

HAL Id: tel-01447763

<https://theses.hal.science/tel-01447763>

Submitted on 27 Jan 2017

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.



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale E2M2
(Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation)

Spécialité de doctorat : Microbiologie
Discipline : Micro-organismes, interactions, infections

Soutenue publiquement le 06 décembre 2016, par :
Dima KHALIL

Résistance aux antibiotiques chez *Mycoplasma bovis*: mécanismes moléculaires et évolution en France

Devant le jury composé de :

Monsieur Jean-Pierre Flandrois, PR, Université de Lyon1 **Examineur et président du jury**

Monsieur Yves Millemann PR, PhD, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort **Rapporteur**

Madame Paola Pilo, PD PhD, HDR, Institute of Veterinary Bacteriology-Bern **Rapporteure**

Madame Cécile Bébéar, PR, MD., PhD., Université de Bordeaux **Examinatrice**

Madame Florence Tardy, CR1, PhD., HDR Anses de Lyon **Directrice de thèse**

À ma mère
À mes frères et sœurs
À ma famille « les Abou Ali »
À Azzam
Au grand « Mohamad Ali »

« Dans la vie, il faut parfois mener une bataille plusieurs fois pour la gagner. »

REMERCIEMENTS

En premier lieu, il apparait opportun de commencer ce mémoire par des remerciements, à ceux qui m'ont beaucoup appris et apporté au cours de ces trois ans et même à ceux qui ont fait partie de cette « aventure » et qui l'ont rendue un moment profitable, inoubliable et agréable.

Je remercie les directeurs respectifs de l'école nationale vétérinaire de Lyon (Vetagro Sup) et de l'Anses de Lyon de m'avoir accueillie et d'avoir financé mon doctorat.

Je tiens à remercier les Docteurs Paola PILO et Yves MILLEMANN d'avoir accepté d'étudier et de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également les Docteurs Cécile BEBEAR et Jean-Pierre FLANDROIS d'avoir accepté d'examiner et de participer à ce jury de thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont à Florence TARDY, tout d'abord pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, l'UMR mycoplasmoses des ruminants, et ensuite pour son encadrement. Merci à Claire BECKER, ma co-encadrante, qui m'a aidée, et donnée de son temps tout au long de ces trois années de thèse. Toutes les deux m'ont épaulée et m'ont guidée durant cette période mais m'ont également laissée autonome dans mes choix et mon organisation de travail.

Avant de continuer, j'aimerais, tout particulièrement, remercier de tout mon cœur ma Cheffe, « la Cheffe », celle qui a été pour moi plus qu'une encadrante, celle qui m'a appris à poser les bonnes questions, à bien réfléchir, à m'organiser (je reste quand même un peu trop bordélique !!), à m'extasier devant un mycoplasme qui a du mal à pousser !! Celle à qui je parlais toujours fort dans son oreille, je lui racontais aussi ma vie (pas tout le temps intéressante, j'avoue)... Mais elle a su m'écouter, me supporter (je sais je parle beaucoup), me comprendre et surtout me guider vers la fin de cette aventure. Mille mercis Florence, t'avoir comme Cheffe était pour moi une vraie chance.

Bon ! Par où je vais commencer ! La liste me paraît un peu longue !

Un grand merci à Agnès. Tu étais plus qu'une collègue (même si tes coups de main étaient très précieux), mais tu étais surtout une vraie amie, je dirais même une mère. Tu étais toujours là quand j'en avais besoin et tu avais les bons mots à me dire pour me conseiller, me reconforter et m'encourager. Merci également à Adélie (#SuperCopine), Tabatha (#maPuce) et Chloé (#SuperCoach) pour votre présence toujours auprès de moi quand j'en avais besoin, de m'avoir supportée même quand j'étais chiante (je l'étais souvent quand même), de me prouver que la route est moins difficile quand on est accompagnée. Merci à Pierre pour ta bonne humeur et tes blagues (même si parfois je n'arrivais pas à les comprendre parce qu'elles étaient tout simplement nulles :-P), à Antoine pour la quantité de gâteaux que tu m'as empêché de manger (#dalleux :-P), à Mégane (#discrète mais super gentille !), Luana , Merci les amis à tous les gouters, les pauses cafés, les apéros et les restos qu'on a partagés. On a toujours bien mangé et bien rigolé (mais pas trop picolé) :-P.

Merci aussi à Patrice pour toutes les discussions intéressantes qu'on a pu avoir, pour ses conseils et son aide. A Estelle, Véro, pour votre gentillesse et votre bonne humeur, à Véronique, Christian, Agnès Chergui, Isabelle, Marisa, Jean-Yves, Agnese, Charlotte. Un grand merci à vous tous, votre présence et votre gentillesse ont rendu cette aventure la plus agréable.

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer à l'Anses durant ces trois années. Même si vous n'êtes pas cités, je vous suis reconnaissante pour tout ce que vous m'avez apporté.

A mon oncle, Mohamad, un immense merci de m'avoir accueillie d'abord en 2009 quand je venais d'arriver en France et puis en 2013 quand je suis arrivée à Lyon. Tu m'as toujours soutenu et encouragé. Je te serai reconnaissante toute ma vie.

Nassim, je ne te remercierai jamais assez, rien que pour tes commentaires à la con qui m'ont toujours fait trop rire. T'es le plus drôle et le plus mignon de tous mes cousins (oh que oui :-P). Sarha (#MaPhotographePro), j'ai enfin l'occasion pour te dire que (OUI) je t'aime et continue à être notre ARTISTE, ça te va super bien :-). Dunia (#PauméeMaisIntelligenteQuandMême), même si tu parais un peu perchée j'avoue, mais une chose est sûre, t'iras bien loin dans ta vie, je te le souhaite et je sais que tu en es capable, mais arrête de faire l'intello avec Nass stp, il va se complexer à cause de toi :-P.

Fouzia, Oh ma Fouz (je ne peux pas écrire l'autre surnom :-D). Une seule chose à te dire, si ton Dieu existe, le dieu de la bonté et de l'amour, tu es sans doute sa messagère. Merci d'avoir pris soin de moi tout au long de ces trois ans, même si je ne le méritais pas toujours. Merci pour toutes les soupes de lentilles, tous les nescaféés qu'on a bus en étant calées au soleil. Merci pour les longues soirées qu'on a passé à se raconter tout et n'importe quoi. Merci à tous les moments de joie qu'on a partagé et tous les fous-rires (ça nous arrivait souvent :-D). Je t'aime comme c'est pas permis (Merci Nanou :-D).

Je tiens à remercier mes chers parents pour l'encouragement qu'ils ont toujours montré, ainsi que pour leurs conseils et dévouement. Merci à ma mère pour son amour et sa tendresse. Merci à mes frères et sœurs, Nazha, Firas, Lama et Hassan, pour tous les moments de joie et de bonheur qu'on a pu partager, mais je vous remercie aussi d'être toujours là aux pires moments pour me soutenir (même en étant loin les uns des autres). Mon père, mon mur porteur, mon premier amour, le grand « Mohamad Ali ». Quoi te dire ! Je sais que je t'avais déçu plusieurs fois, j'espère qu'aujourd'hui, j'arrive à te rendre (enfin !) un peu fière de moi. Je suis heureuse d'avoir l'occasion de vous témoigner tous, ma très belle famille, mon amour.

A Azzam, mon ami, mon amour et mon futur mari. Merci pour ton soutien indéfectible tout au long de ce long chemin, depuis notre rencontre en 2010 à Clermont Ferrand jusqu'à aujourd'hui. Tu as toujours cru en moi. Tu m'as toujours supportée même avec mes sauts d'humeur et mes crises de nerfs qui arrivaient assez souvent. Tu m'as offert un grand amour, je t'offre ma vie.

Résumé

Mycoplasma (M.) bovis est une bactérie pathogène des bovins, à l'origine de signes cliniques divers, comme des mammites, des arthrites, des otites et des bronchopneumonies, ces dernières étant majoritaires en France. Les mycoplasmoses à *M. bovis* ont un fort coût économique et leur contrôle impose une importante mobilisation sanitaire et un recours très fréquent à l'antibiothérapie. Peu de données étaient disponibles jusque récemment concernant le typage moléculaire et l'antibiosensibilité des souches françaises de *M. bovis*. Deux études antérieures à ce travail et réalisées au sein de l'UMR « Mycoplasmoses des ruminants » ont montré que les isolats cliniques de *M. bovis* collectés en France après 2000 appartiennent à un sous-type moléculaire majoritaire (ST2), très homogène et sont par ailleurs multirésistants à la plupart des familles antibiotiques à l'exception des fluoroquinolones. Ces résultats suggèrent la diffusion sur le territoire national d'un clone unique multirésistant.

Le premier objectif de cette étude était de déterminer les mécanismes à la base de la perte de sensibilité aux antibiotiques des isolats français. Dans un deuxième temps, les liens entre les différents sous-types moléculaires, les profils d'antibiosensibilité, les maladies associées et le polymorphisme des gènes cibles des antibiotiques ont été investigués. Cette approche a été déployée pour trois familles d'antibiotiques utilisées en pratique vétérinaire: les macrolides, les tétracyclines et également les fluoroquinolones, quoique récemment classées comme molécules critiques.

De façon générale, les mutations identifiées dans les cibles des antibiotiques expliquent à elles seules les phénotypes de résistance observés. Des mutations dans les ARNs ribosomiaux, cibles des macrolides et des tétracyclines, ont été observées sur des isolats cliniques dès 1978 et sont devenues systématiques sur tous les isolats collectés après 2000 et appartenant au sous-type ST2 majoritaire. En ce qui concerne les fluoroquinolones, la faible augmentation des CMI (concentrations minimales inhibitrices) mesurée chez la plupart des isolats cliniques récents n'a pas été associée à des mutations des QRDR (« Quinolones Resistance-Determining Regions »). Par contre, des altérations cumulées de façon séquentielle dans ces QRDR, associées à une hausse des CMI, ont été mises en évidence lors d'expériences de sélection *in vitro* et majoritairement pour des souches appartenant à un sous-type récent minoritaire, ST3, apparemment plus variable et plus apte à fixer les mutations. En 2013, le premier isolat clinique présentant une CMI augmentée aux fluoroquinolones a été isolé: il appartient à ce sous-type ST3. L'ensemble des résultats obtenus montrent que les différents sous-types de *M. bovis* n'évoluent pas de la même façon vers la résistance. Ce constat ajouté à celui de la multirésistance des isolats récents (ST2 ou ST3) met en

exergue l'intérêt de la surveillance (sous-typage et antibiosensibilité) et le suivi de l'évolution des isolats de *M. bovis* circulant en France. Ce suivi permettrait notamment d'anticiper une éventuelle émergence de la résistance aux fluoroquinolones.

Mots clés : *M. bovis*, sensibilité, CMI, sous-typage, fluoroquinolones, macrolides, tétracyclines

Abstract

Mycoplasma (M.) bovis is a bacterial pathogen for cattle, responsible for various clinical signs, like mastitis, arthritis, otitis and respiratory diseases, the latter being the main syndrome present in France. Mycoplasmoses have a great economic impact and their control entails drastic sanitary measures and a frequent use of antibiotherapy. Few data was available until recently on the molecular subtyping and the antimicrobial susceptibility of the French strains of *M. bovis*. Two previous studies done in the UMR « Mycoplasmoses des ruminants » proved that clinical isolates collected in France after the year 2000 belonged to one major subtype (ST2), which is very homogeneous, and that they were multiresistant to the main antimicrobial families except fluoroquinolones. These results suggested the diffusion of one unique multiresistant clone on the national territory.

The first aim of the present study was to decipher the molecular mechanisms underlying the loss of susceptibility to antimicrobials of the French strains. Secondly the links between the molecular subtypes, the antibiotics susceptibility profiles, the clinical origins and the polymorphisms of the target genes were assessed. This approach was used for 3 antimicrobial families currently used in veterinary medicine: macrolides, tetracyclines and fluoroquinolones, although recently classified as critical.

Actually, the point mutations observed in the target genes of the antimicrobials accounted for the observed resistance phenotypes. Some mutations in the ribosomal RNAs, targets of the macrolides and the tetracyclines, were observed in clinical isolates as soon as 1978 and they were generalized in all isolates collected after 2000 and belonging to the major subtype ST2. Concerning the fluoroquinolones, the slight increase in MIC (Minimum Inhibitory Concentration) observed in most of the recent isolates was not associated with mutations in the QRDR (Quinolone Resistance-Determining Regions). However alterations that were associated with increased MICs were highlighted and proved to be sequentially cumulated during experiments of *in vitro* selection under antimicrobials pressure. This was mainly true for strains belonging to a recent and uncommon subtype, ST3, which is apparently more variable and more able to fix the mutations. In 2013 the first clinical strain showing an increased MIC to fluoroquinolones was isolated and proved to belong to ST3. The whole results of this study showed that the different subtypes did not evolve with the same speed towards resistance. This fact, associated with the multiresistant phenotype of the recent isolates (ST2 or ST3), highlights the urge to monitor (subtyping and antimicrobial susceptibility

profiles) and to follow-up the evolution of the isolates of *M. bovis* circulating in France in order to anticipate a potential emergence of the resistance to fluoroquinolones.

Key-words: *M. bovis*, drug resistance, MIC, subtyping, Fluoroquinolones, macrolides, tetracyclines

Table des matières

Liste des tableaux et figures	12
Introduction générale.....	14
Revue bibliographique	16
1 Antibiotiques et antibiorésistance	17
1.1 Antibiotiques	17
1.1.1 Définition.....	17
1.1.2 Classification	17
1.2 Antibiorésistance bactérienne.....	19
1.2.1 Résistance intrinsèque	21
1.2.1.1 Imperméabilité de la membrane externe	21
1.2.1.2 Absence de paroi	21
1.2.1.3 Efflux actif.....	22
1.2.1.4 Inactivation enzymatique des antibiotiques.....	23
1.2.2 Résistance acquise.....	23
1.2.2.1 Accès à la cible.....	24
1.2.2.1.1 Défaut de pénétration dans la cellule	24
1.2.2.1.2 Efflux actif	24
1.2.2.2 Inactivation enzymatique de l'antibiotique	25
1.2.2.3 Défaut d'affinité de l'antibiotique avec sa cible.....	25
1.2.2.3.1 Mutation de la cible	27
1.2.2.3.2 Protection de la cible.....	27
1.2.2.4 Surexpression de la cible	28
1.2.3 Détection et détermination du niveau de résistance	28
1.2.3.1 Méthodes de quantification de la sensibilité/ la résistance.....	29
1.2.3.1.1 Méthodes de diffusion :	30
1.2.3.1.2 Méthodes de dilutions	31
1.2.3.2 Méthodes alternatives.....	32
1.2.3.2.1 Recherche des facteurs de résistance	32
1.2.3.2.2 Méthodes basées sur des nouvelles technologies.....	32
2 Mycoplasmes	34
2.1 Historique	34
2.2 Classification.....	34
2.3 Caractéristiques des mycoplasmes	36
2.4 Les mycoplasmoses des ruminants- Focus sur les mycoplasmoses à <i>M. bovis</i>	38

2.4.1	Caractéristiques	39
2.4.2	Implication de <i>M. bovis</i> dans les bronchopneumonies infectieuses enzootiques (BPIE)..	41
2.4.2.1	Étiologie et signes cliniques	41
2.4.2.2	Prévention.....	42
2.4.2.3	Traitement des BPIE.....	43
2.4.2.4	Recherche spécifique de <i>M. bovis</i> comme agent étiologique des BPIE.....	44
2.4.2.5	Epidémio-surveillance de <i>M. bovis</i>	46
3	Antibiotiques et mycoplasmes.....	48
3.1	Les tétracyclines	49
3.1.1	Définition.....	49
3.1.2	Mode d'action.....	49
3.1.3	Etat des lieux de la résistance chez les mycoplasmes.....	50
3.2	Les macrolides.....	52
3.2.1	Définition.....	52
3.2.2	Mode d'action.....	52
3.2.3	Etat des lieux de la résistance chez les mycoplasmes.....	53
3.3	Les fluoroquinolones	55
3.3.1	Définition.....	55
3.3.2	Mode d'action.....	55
3.3.3	Etat des lieux de la résistance chez les mycoplasmes.....	56
4	Contexte et objectifs du travail	58
4.1	Contexte : Etat des lieux de la résistance en France chez <i>M. bovis</i>	58
4.2	Objectifs de l'étude	60
4.2.1	CHAPITRE 1 : les fluoroquinolones.....	60
4.2.2	CHAPITRE 2 : les macrolides et les tétracyclines	61
	CHAPITRE 1.....	64
	CHAPITRE 2.....	66
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	113
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	124

Liste des tableaux et figures

Tableau 1 : Principaux modes d'action des différentes familles d'antibiotiques p.19

Tableau 2 : Principaux mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques chez les bactéries p.27

Tableau 3 : Les mycoplasmes pathogènes chez les ruminants p.41

Tableau 4 : Caractéristiques de trois familles d'antibiotiques utilisées chez les bovins et décrites dans cette étude p.49

Tableau 5 : Résistance acquise aux tétracyclines chez les mycoplasmes p.52

Tableau 6 : Résistance acquise aux macrolides chez les mycoplasmes p.55

Tableau 7 : Résistance acquise aux fluoroquinolones chez les mycoplasmes p.58

Figure 1 : Sélection de souches résistantes sous pression de sélection exercée par exposition à un antibiotique p.20

Figure 2 : Différentes formes de résistances bactériennes aux antibiotiques : phénotypique et génotypique (intrinsèque ou acquise) et leurs supports moléculaires p.21

Figure 3 : Représentation des différents types de pompes à efflux des bactéries Gram+ et Gram- et leur source d'énergie p.23

Figure 4 : Antibiogramme et droite de concordance, méthode standard utilisée pour la détermination de CMI p.31

Figure 5 : Détermination des CMI par dilution en milieu gélosé p.32

Figure 6 : Historique de la découverte des mycoplasmes : des bactéries virus-like au genre *Mycoplasma*. p.36

Figure 7 : Classification phylogénétique des mycoplasmes basée sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S (<http://www.molligen.org>) p.38

Figure 8 : Colonies de *M. bovis* (souche 1067) sur milieu gélosé, observées sous loupe binoculaire p.39

Figure 9 : Représentation de l'interaction entre la tétracycline composé de 4 cycles A, B, C et D (en jaune) et les résidus H34 (1196-1200 :1053-1056) et H31 (964-967) de l'ARNr 16S p.50

Figure 10 : Interaction entre la tylosine (en violet) et les différents domaines de l'ARNr 23S du ribosome et la protéine L22 p.53

Figure 11 : Distribution d'une population d'isolats de *M. bovis* collectés en France en fonction de la valeur de CMI mesurée pour l'enrofloxacin et la tylosine p.60

Introduction

Les mycoplasmoses sont des maladies bactériennes majeures chez les ruminants en raison de leurs conséquences économiques et de l'importante mobilisation sanitaire pour leur contrôle qui repose notamment sur des traitements antibiotiques. Par exemple, les bronchopneumonies infectieuses et enzootiques (BPIE) chez le veau sont des maladies multifactorielles traitées souvent par les bêta-lactamines dans le but d'éliminer les *Pasteurellaceae*, considérées comme l'agent principal en cause. Ces traitements antibiotiques réguliers, qui ciblent et éliminent les pasteurelles, favorisent l'implantation des mycoplasmes naturellement résistants à ces molécules. Ces derniers persistent chez l'animal et induisent une infection chronique.

Jusque récemment, aucune étude approfondie d'antibiosensibilité n'avait été réalisée sur les mycoplasmes des ruminants en France. Par conséquent, un projet visant à réaliser un état des lieux de l'antibiosensibilité des principaux mycoplasmes de ruminants présents sur le territoire français a été lancé en 2012 au sein de l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants. Ce projet avait comme objectifs : 1) développer un savoir-faire en matière de méthodologies pour mesurer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des antibiotiques pour les mycoplasmes en l'absence de méthode standard et en raison de l'impossibilité d'utiliser la méthode classique de diffusion en milieu gélosé (incompatible avec une croissance lente et des milieux complexes), 2) déterminer l'état actuel de l'antibiosensibilité des mycoplasmes des ruminants et comparer avec les isolats anciens, et 3) en l'absence de valeurs cliniques définies pour les mycoplasmes, essayer de déterminer des seuils épidémiologiques pour la résistance des mycoplasmes. Deux publications sont d'ores et déjà issues de ces études d'antibiosensibilité au sein de l'UMR, décrivant l'évolution du niveau de sensibilité des mycoplasmes des espèces *Mycoplasma (M.) bovis* (1) et *M. agalactiae* (2).

A l'origine, le présent projet de thèse avait une ambition large et visait à élucider les mécanismes moléculaires qui expliquaient les phénotypes de résistance observés chez différentes espèces. Etant données la diversité et l'hétérogénéité de la résistance d'une espèce à une autre, nous avons choisi de nous focaliser sur *M. bovis* afin de simplifier le sujet et de le rendre réalisable.

M. bovis est un agent de première importance pour les BPIE chez le veau. Des résistances plus ou moins récentes (début des années 2000) aux macrolides, tétracyclines et fluoroquinolones ont été décrites dans différents pays. Ce phénotype de résistance et l'usage

courant de ces antibiotiques dans les traitements des BPIE justifient le choix de ces trois familles pour cette étude.

Cette étude débute par une revue bibliographique décrivant, en premier lieu, le phénomène d'antibiorésistance chez les bactéries d'une manière générale, les caractéristiques des mycoplasmes et notamment de *M. bovis*, puis enfin une troisième partie sera consacrée à la résistance aux antibiotiques chez les mycoplasmes et plus précisément chez *M. bovis*.

Revue bibliographique

1 Antibiotiques et antibiorésistance

1.1 Antibiotiques

1.1.1 Définition

Par définition, un antibiotique est un composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, dont l'activité se manifeste, à très faible dose et d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux des microorganismes ou même de certaines cellules des êtres pluricellulaires. Toutefois, aujourd'hui, l'utilisation de ce terme est restreinte aux seules substances à activité antibactérienne. La plupart des antibiotiques sont des substances hémi-synthétiques, issues de la modification chimique de molécules naturelles, généralement produites par des microorganismes du sol.

1.1.2 Classification

La classification des antibiotiques repose sur différents critères : leur origine (produit naturellement par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*, ou bien issus du génie chimique), leurs caractéristiques chimiques (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques), physiques (hydrophile, hydrophobe ou lipophile...), pharmacodynamiques et pharmacocinétiques ou leur spectre d'activité antibactérienne (Gram+, Gram-, spectre large ou restreint...).

Dans la pratique médicale, l'antibiotique est caractérisé, outre son spectre d'activité et son mode d'action (pharmacodynamie), par sa capacité à accéder à sa cible, à persister dans le site infectieux et à être éliminé après administration. Ces critères définissent la pharmacocinétique d'un antibiotique. Ce paramètre oriente le choix de la prescription d'un traitement et permet de prédire le devenir de l'antibiotique dans l'organisme après administration, et en particulier sa zone de concentration.

Ensuite, le spectre d'activité d'un antibiotique définit l'ensemble des espèces bactériennes qui lui sont sensibles. Cette caractéristique essentielle guide le plus souvent la prescription. Par exemple, un antibiotique à spectre large, réputé actif sur de nombreuses bactéries est souvent prescrit en prévention, en première intention et antérieurement au diagnostic. Par contre, un antibiotique à spectre d'activité dit « étroit » est limité à un certain nombre d'espèces bactériennes cibles, et n'est généralement prescrit qu'après diagnostic et identification de l'agent pathogène, même si quelques prescriptions se font en cas de suspicion d'un agent, en amont de sa confirmation diagnostique.

Les antibiotiques peuvent également être classés suivant qu'ils sont bactéricides ou bactériostatiques (3), suivant leur mode d'action. Par définition, un antibiotique bactéricide est une molécule qui stoppe la croissance bactérienne et tue l'agent pathogène tandis qu'un antibiotique bactériostatique est une molécule qui inhibe la croissance bactérienne sans tuer la bactérie. Par exemple, les β -lactamines, les glycopeptides et les lipopeptides agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne. La colistine et les fluoroquinolones tuent les bactéries en désorganisant leur membrane et en inhibant la synthèse de l'ADN respectivement. Toutes ces familles ont donc une activité bactéricide sur les bactéries cibles. Par contre, l'effet bactériostatique des tétracyclines, macrolides (et apparentés : lincosamides et kétolides) et aminoglycosides est dû à une inhibition de la synthèse protéique en agissant sur les ribosomes. Le tableau 1 résume les quatre différents modes d'action des diverses familles d'antibiotiques.

Tableau 1 : Principaux modes d'action des différentes familles d'antibiotiques et de leur effet.

Modes d'actions	Effet	Familles d'antibiotique
Inhibition de la synthèse de la paroi	Bactéricide	β -lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes) Glycopeptides (vancomycine, avoparcine) Lipopeptides cycliques (daptomycine)
Désorganisation de la membrane	Bactéricide	Polymyxines (colistine, polymyxine B, surfactine)
Inhibition de la synthèse protéique	Bactériostatique	Tétracyclines (tétracycline, doxycycline, oxytétracycline) Macrolides et Kétolides (erythromycine, josamycine, tylosine, tilmicosine, tulathromycine, gamithromycine, télithromycine) Lincosamides (lincomycine, clindamycine) Aminosides (kanamycine, gentamicine, streptomycine, amikacine)
Inhibition de la synthèse des acides nucléiques ADN/ ARN	Bactéricide	Fluoroquinolones (ciprofloxacine, enrofloxacine, danofloxacine, marbofloxacine) Rifamicines (rifampicine, rifabutine, rifalazile) Sulfamides

Le choix de prescription d'une molécule devra être adapté en fonction des critères pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de l'antibiotique mais aussi de la sensibilité attendue du micro-organisme ciblé. Ce dernier paramètre peut être estimé par les données de sensibilité obtenues *in vitro*. Différentes méthodes pour l'obtention de données de sensibilité *in vitro* sont utilisées et seront détaillées plus tard dans cette revue bibliographique.

1.2 Antibiorésistance bactérienne

Au fil des générations, les bactéries doivent s'adapter en permanence aux conditions environnementales. L'évolution bactérienne, sous pression de sélection, est la preuve de la capacité de ces microorganismes à faire face à de nouvelles situations (4). Depuis la découverte et l'utilisation des antibiotiques (mise sur le marché de la pénicilline G en 1940 après sa découverte en 1928 par Alexandre Fleming), l'antibiothérapie a permis la guérison efficace d'un grand nombre de maladies d'origine bactérienne et d'améliorer l'espérance de vie humaine et animale. Néanmoins, l'antibiothérapie a aussi entraîné l'émergence des résistances bactériennes, une réponse adaptative de la part des bactéries vis-à-vis de ces traitements. Dès 1943, date à laquelle les premiers isolats cliniques de staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) résistaient à la pénicilline, on a commencé à parler de résistance aux antibiotiques. Depuis, l'utilisation, parfois excessive et non contrôlée des antibiotiques, a accéléré le développement de ces résistances et assuré leur maintien dans les populations bactériennes (5). La résistance représente une menace croissante pour la santé publique, humaine et animale, en raison des échecs thérapeutiques qu'elle entraîne et parce qu'elle concerne un large panel d'agents pathogènes.

La figure 1 illustre le processus de sélection de souches résistantes dans une population bactérienne donnée après exposition à des traitements antibiotiques. Les souches sensibles

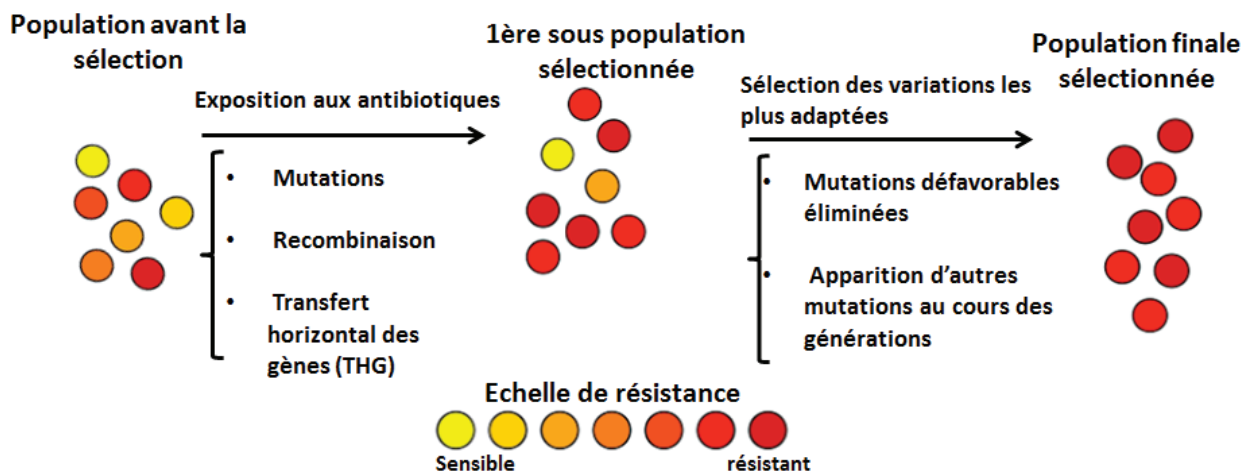


Figure 1 : Sélection de souches résistantes sous pression de sélection exercée par exposition à un antibiotique.

d'une population peuvent devenir résistantes suite à une ou plusieurs modifications génétiques et sont sélectionnées suite aux traitements antimicrobiens (Figure 1).

Les modifications génétiques conduisant à l'antibiorésistance sont généralement causées par des mutations ponctuelles, par acquisition d'un nouveau gène suite à un transfert horizontal ou un événement de recombinaison entre deux bactéries (Figure 1). La résistance acquise commence par quelques clones isolés qui deviennent majoritaires sous pression de sélection exercée par l'antibiotique. Elle ne concerne donc qu'une proportion plus ou moins importante d'une espèce, et elle est variable dans le temps. Aujourd'hui, beaucoup d'agents pathogènes sont caractérisés, non seulement par la résistance à un type d'antibiotique, mais aussi par la résistance croisée à plusieurs molécules. Les souches résistantes, qui sont minoritaires au début de la sélection, deviennent majoritaires sous pression d'antibiotiques. La résistance génotypique peut être portée par plusieurs supports génétiques dans le chromosome ou par des éléments génétiques mobiles acquis lors d'évènements de transfert horizontaux (Figure 2). La figure 2 montre qu'une résistance génotypique peut être intrinsèque chez certaines bactéries : elle est portée par des déterminants chromosomiques qui préexistaient dans la population sauvage en absence de toute forme de sélection. Il s'agit d'une caractéristique constitutive d'une espèce.

Par ailleurs, la résistance bactérienne peut aussi être tout simplement phénotypique, adaptative et sans modification génétique associée. Cette forme de résistance est liée à la formation des biofilms, aux formes de persistance ou à la motilité type « swarming » (6) au moment de l'exposition aux antibiotiques. Elle n'est pas transmise aux cellules filles. Dans la

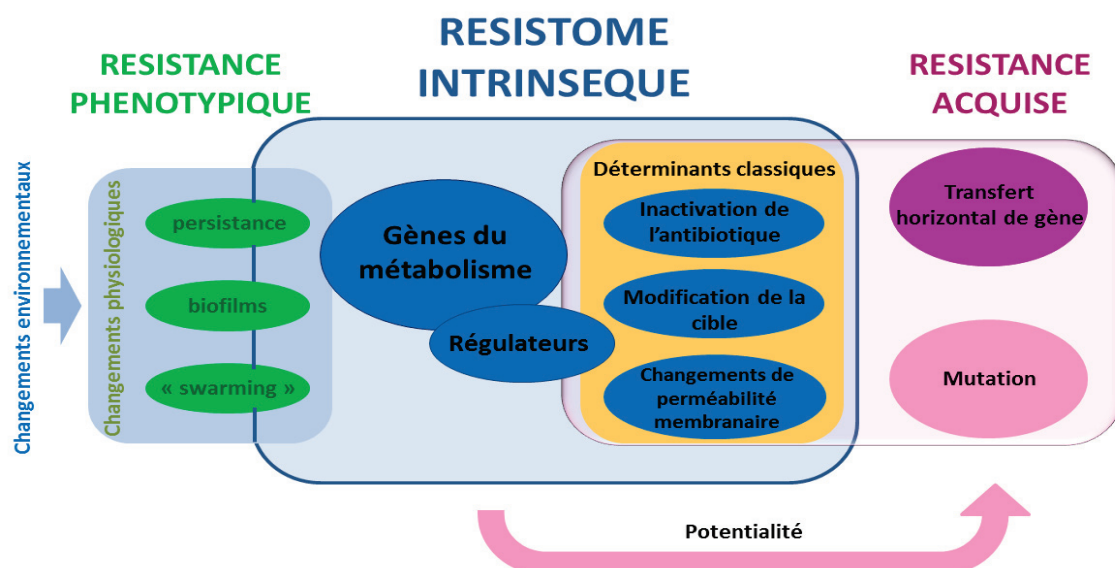


Figure 2 : Différentes formes de résistances bactériennes aux antibiotiques : phénotypique et génotypique (intrinsèque ou acquise) et leurs supports moléculaires (6).

Résistome : Ensemble des gènes conférant la résistance

suite de cette revue bibliographique, seule la résistance génotypique, intrinsèque ou acquise, sera détaillée.

1.2.1 Résistance intrinsèque

Les bactéries peuvent être naturellement résistantes à différentes classes d'antibiotiques. Cette forme de résistance, appelée constitutive ou intrinsèque, peut être caractéristique d'une espèce bactérienne ou d'un genre (7). De ce fait, elle peut être parfois utilisée comme moyen d'identification d'une espèce donnée ou de discrimination entre espèces. Elle repose généralement sur des déterminants classiques, portés par le chromosome et conduit à des phénomènes tels que l'imperméabilité de la paroi externe, les systèmes d'efflux aspécifiques mais aussi d'autres mécanismes moins fréquents détaillés dans les sections suivantes (Figure 3) (8).

1.2.1.1 Imperméabilité de la membrane externe

L'existence d'une membrane externe en plus de la paroi chez les bacilles à Gram- leur procure naturellement une barrière supplémentaire vis-à-vis du milieu extérieur. Cette membrane peut assurer une protection contre les antibiotiques. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène difficile à traiter, est classée comme naturellement résistante à plusieurs classes d'antibiotiques à cause de sa membrane externe hautement imperméable. Cette membrane est caractérisée par une limite d'exclusion très haute privilégiant le passage des molécules de grande taille (~3000Da), ce qui retarde le transfert passif de beaucoup de petites molécules, dont les antibiotiques (8). Cette imperméabilité n'aboutit en général pas à un niveau de résistance très élevé (8).

1.2.1.2 Absence de paroi

La paroi, qui est un élément structural bactérien, est présente chez toutes les espèces bactériennes, à Gram+ et Gram-, sauf chez les mycoplasmes. Ces derniers possèdent, en effet, un génome de taille réduite suite à une évolution régressive ayant entraîné la perte de plusieurs gènes dont ceux impliqués dans la synthèse de la paroi. Par conséquent, les mycoplasmes sont intrinsèquement résistants aux β -lactamines, antibiotiques inhibant la synthèse des peptidoglycanes, un des constituants majeurs de la paroi.

1.2.1.3 Efflux actif

Le système d'efflux actif est médié par des pompes protéiques transmembranaires provoquant une excrétion rapide des déchets cataboliques. On l'appelle aussi mécanisme de détoxification de la cellule. Ce système peut contribuer à éliminer les molécules antibiotiques en dehors de la cellule et empêcher leur action sur leurs cibles. Ces pompes sont caractérisées par des spécificités moléculaires variables. Il existe des pompes à efflux aspécifiques, dites universelles, ou d'autres qui sont beaucoup plus restreintes et spécifiques à un seul type de molécule. Les différents systèmes d'efflux chez les bactéries Gram⁺ et Gram⁻ sont : 1) les transporteurs à « ATP-binding cassette » (transporteurs ABC), 2) les protéines d'extrusion MATE (« Multidrug And Toxic compound Extrusion »), 3) la famille des protéines Résistance/Nodulation/Division cellulaire (RND), 5) la superfamille des pompes majeures MFS (« Major Facilitator Superfamily ») et 6) la famille des petites pompes à résistance multiple SMR (« Small Multidrug Resistance ») (9, 10) (Figure 3). Les pompes à efflux peuvent aussi être classées en fonction de leur source d'énergie, certaines utilisant la dissipation d'un gradient de protons (SMR, MFS, RND) ou d'ions Na⁺ (MATE), d'autres hydrolysant l'ATP(ABC).

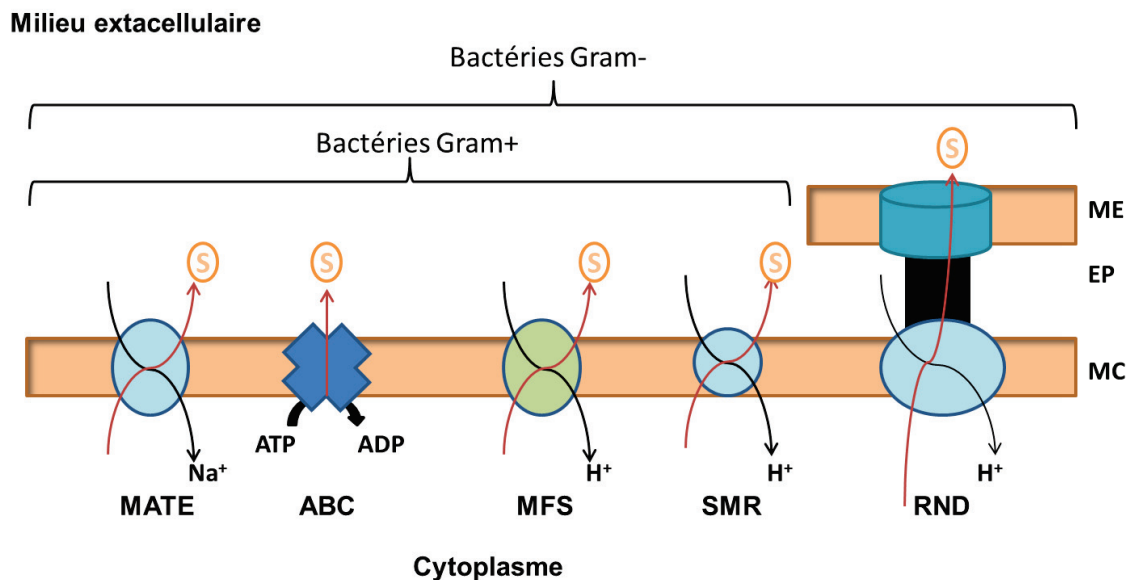


Figure 3 : Représentation des différents types de pompes à efflux des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ et leur source d'énergie (10).

Chez la même bactérie, plusieurs systèmes d'efflux peuvent exister et parfois co-fonctionner.

ME : membrane externe ; **EP :** espace périplasmique ; **MC :** membrane cytoplasmique, **S :** substrat

MATE: Multidrug And Toxic compound Extrusion, **ABC:** ATP-binding cassette, **MFS:** Major Facilitator Superfamily, **SMR:** Small Multidrug Resistance, **RND:** Résistance/Nodulation/Division cellulaire

Chez *Escherichia coli*, un bacille à Gram-, généralement considéré comme commensal chez les mammifères à l'exception de quelques souches qui sont pathogènes et qui causent des gastro-entérites, des infections urinaires ou des méningites, une pompe à efflux de type RND transporteur a été décrite chez quelques souches comme responsable de sa résistance intrinsèque à plusieurs familles d'antibiotiques comme les tétracyclines, les fluoroquinolones, les β -lactamines et les macrolides (11).

1.2.1.4 Inactivation enzymatique des antibiotiques

Certaines bactéries possèdent naturellement dans leur chromosome des gènes codant des enzymes, les β -lactamases, qui dégradent les antibiotiques de la famille des β -lactamines avant qu'ils n'atteignent leurs cibles. *Stenotrophomonas maltophilia*, un agent pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales, produit naturellement deux métallo-enzymes, qui en présence d'ions Zn^{2+} , hydrolysent les β -lactamines (12). Quelques souches de *Klebsiella pneumoniae*, une bactérie impliquée aussi dans des infections nosocomiales, sont naturellement résistantes aux pénicillines en produisant une β -lactamase d'origine chromosomique (13). D'autres enzymes dégradant d'autres antibiotiques existent, mais sont exclusivement impliquées dans des résistances acquises qui seront décrites dans la section 1.2.2.2.

1.2.2 Résistance acquise

L'utilisation répétée et parfois excessive des antibiotiques maintient une pression de sélection continue sur les bactéries. Cette pression accélère le développement et la diffusion de souches résistantes aux antibiotiques. A l'inverse des résistances intrinsèques, les résistances acquises résultent de :

- mutations chromosomiques ou,
- acquisition d'un nouveau gène par transfert horizontal (transformation ou conjugaison des gènes chromosomiques ou plasmidiques) pouvant aussi conférer une résistance à un antibiotique (Figure 2).

Les gènes-supports de la résistance, nouvellement acquis ou mutés, sont ensuite transmis par voie verticale de cellule mère à cellule fille (3). Le tableau 2 résume les différents mécanismes de la résistance acquise qui seront détaillés dans les paragraphes suivants. Plusieurs mécanismes ont été déjà cités dans le paragraphe de la résistance intrinsèque mais d'autres sont spécifiques à la résistance acquise.

1.2.2.1 Accès à la cible

1.2.2.1.1 Défaut de pénétration dans la cellule

Pour accéder à leurs cibles, les molécules d'antibiotiques sont amenées à passer plusieurs barrières : capsule, paroi externe, membrane cytoplasmique. Ce passage se fait par diffusion passive ou par la voie des porines ou des lipopolysaccharides (LPS). Chez *P. aeruginosa*, une mutation dans le gène codant pour la protéine monomérique de la porine OmpD empêche le passage de l'imipénème à travers la membrane externe. Cette mutation confère à la bactérie une résistance à cette molécule (14).

1.2.2.1.2 Efflux actif

Ce système a été déjà décrit dans la section 1.2.1.3, lors de la description des résistances intrinsèques. Dans le cas de la résistance acquise, une mutation dans les promoteurs des gènes codant un système d'efflux peut avoir comme résultat la surexpression de ces gènes. L'efflux actif, qui existe déjà chez la bactérie, devient alors plus efficace en excréant massivement la molécule d'antibiotique à l'extérieur de la cellule. Il y a donc bien acquisition de résistance. Les pompes à efflux sont généralement aspécifiques et confèrent ainsi aux bactéries une résistance à plusieurs molécules. Ce mécanisme a été déjà décrit chez plusieurs bactéries, comme *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Enterococcus faecalis* (15, 16). Chez *P. aeruginosa*, la surexpression du transporteur RND, suite à une modification de son promoteur, conduit à une résistance acquise aux fluoroquinolones (16).

1.2.2.2 Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Chez les bactéries, ce type de résistance repose sur deux mécanismes : 1) la surexpression d'une enzyme déjà existante, inactivant l'antibiotique ou, 2) l'acquisition d'un gène plasmidique ou d'un transposon codant ce même type d'enzyme. Chez *S. aureus*, ces deux mécanismes ont déjà été décrits. Une hypersécrétion de la pénicillinase, provoquant l'hydrolyse de la pénicilline M, confère une résistance à bas niveau à l'oxacilline, antibiotique appartenant au groupe M de la famille des β -lactamines (17). La résistance acquise aux aminosides des staphylocoques est due à une modification de la structure des aminosides par des enzymes intracellulaires, codées par des gènes plasmidiques ou des transposons. Trois types d'enzymes, APH (phosphotransférase), ANT (nucléotidyltransférase) ou AAC (acétyltransférase), peuvent modifier les molécules d'aminosides. Quelques isolats de *Streptococcus pyogenes* ont été décrits comme résistants aux aminosides. Ces isolats résistants ont acquis par transfert horizontal des gènes codant des enzymes type APH et ANT inactivant la kanamycine et la streptomycine (18).

Plus récemment, la résistance à la colistine médiée par une enzyme, le MCR-1 (Mobile Colistin Resistance), dont le gène est porté par un plasmide, devient de plus en plus répandue chez plusieurs espèces bactériennes comme *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae* (19, 20). Cette enzyme qui dégrade la colistine confère à ces bactéries un niveau de résistance assez élevé à la colistine.

1.2.2.3 Défaut d'affinité de l'antibiotique avec sa cible

Chaque molécule d'antibiotique se fixe sur une cible bien précise dans la cellule bactérienne afin d'inhiber sa fonction et par conséquent inhiber la croissance de la bactérie (effet bactériostatique) ou la tuer (effet bactéricide). La cible peut être des enzymes ou des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi dans le cas des β -lactamines et des aminosides, le ribosome dans le cas des macrolides et tétracyclines ou des gyrases et des topoisomérases dans le cas des fluoroquinolones. Les cibles peuvent être modifiées suite à plusieurs mutations spontanées dans les gènes correspondants, ou échapper à la reconnaissance par les antibiotiques en étant masquées par des protéines protectrices. Dans les deux cas, on assiste à un phénomène de résistance acquise.

Mécanismes de résistance	Gènes ou protéines impliqués	Molécules d'antibiotique	Espèces	Références
Accès à la cible	Défaut de pénétration	Imipénème	<i>P. aeruginosa</i>	(14)
	Défaut d'accumulation ou efflux actif	Fluoroquinolones Tétracyclines Macrolides	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i>	(11) (16) (15)
	Inactivation enzymatique de l'antibiotique	Pénicilline M Kanamycine Ampicilline Colistine	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> ,	(17) (18) (19, 20)
Mutation de la cible	PBPs	β -lactamines	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i>	(18)
	ADN gyrase, topoisomérase (QRDR)	Fluoroquinolones	<i>Streptococcus spp.</i> <i>P. mirabilis</i> <i>E. coli</i>	(21) (22) (23, 24)
	Grande Sous unité du ribosome (23S ARNr)	Macrolides	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	(26) (25,27)
	Protéines ribosomales L4 et L22	Macrolides et lincosamides	<i>S. pneumoniae</i>	(28)
	Petite sous unité du ribosome (16S ARNr)	Tétracyclines	<i>Helicobacter pylori</i>	(31)
Protection de la cible	Méthylation de la <i>erm</i> (23S ARNr)	Macrolides (érythromycine)	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	(30) (27)
Protection de la cible	Tet M (ribosomes) <i>qnr</i>	Tétracyclines Fluoroquinolones	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> , <i>Salmonella enterica</i>	(33) (34, 35,36)
Surexpression de la cible	VanA cluster/ transposon Tn1564(Paroi) DHR	Glycopeptides (Vancomycine) Sulfamides	<i>Enterococcus spp.</i> <i>E. coli</i> , <i>H. influenzae</i>	(32) (37, 38)

Tableau 2: Exemples résumant les principaux mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques chez les bactéries. Toutes les abréviations sont détaillées dans le texte.

1.2.2.3.1 Mutation de la cible

La modification des cibles des antibiotiques peut être le résultat de mutations ponctuelles dans les séquences génomiques codant ces cibles. Dans le cas des fluoroquinolones, le génotype généralement associé au phénotype résistant est caractérisé par des mutations qui modifient certains acides aminés des sous-unités des topoisomérases, enzymes responsables du surenroulement de l'ADN. Ces mutations se trouvent dans des régions appelées QRDR (Quinolone Resistance Determining Regions). Ces régions se retrouvent dans les protéines GyrA et GyrB, les deux sous-unités de la gyrase et ParC et ParE, les deux sous-unités de la topoisomérase IV. Ce mécanisme a été largement décrit chez un large éventail de bactéries comme *E. coli*, les streptocoques, *Proteus mirabilis* et les mycoplasmes (21-24). Certaines mutations ponctuelles identifiées dans les QRDR ont été appelés « hot spots » dans la mesure où ils sont systématiquement associés à un haut niveau de résistance.

De même, la résistance aux macrolides, molécules qui ciblent le ribosome et la synthèse protéique, a été associée à des modifications ponctuelles dans les ARNs ribosomiaux chez plusieurs germes comme *E. coli*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* et *Bacillus (B.) subtilis* (25-30). Des mutations dans les protéines ribosomiales, L4 et L22, ont été aussi associées à des résistances à l'érythromycine. Les modifications de la conformation de ces protéines, dues aux mutations, diminuent l'affinité de l'érythromycine au ribosome (29). En plus, la résistance aux tétracyclines chez *Helicobacter pylori* a été associée avec des mutations dans l'ARNr 16S (31)

1.2.2.3.2 Protection de la cible

Ce mécanisme a été décrit chez quelques souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine, molécule active ciblant la synthèse de la paroi bactérienne. Ces bactéries produisent un précurseur altéré du peptidoglycane, qui ne sera pas reconnu par la vancomycine. Par conséquent, cette dernière ne réussit plus à inhiber la synthèse de la paroi (32).

La méthylation de la cible de l'antibiotique est un autre moyen pour changer sa structure et diminuer son affinité avec l'antibiotique. Chez un grand nombre de bactéries résistantes aux macrolides, plus spécifiquement à l'érythromycine, des gènes de méthylation *erm* (« erythromycin ribosomal methylase ») ont été décrits (27, 30). Par exemple, chez les staphylocoques et streptocoques, les protéines *erm* « méthylient » une adénine dans la séquence du 23S ARNr, un des constituants de la grande sous-unité 50S du ribosome. Cette

région, où se situe l'adénine, joue un rôle principal dans la fixation de l'antibiotique sur le ribosome et une fois méthylée, son affinité pour l'antibiotique diminue (28).

Un autre mécanisme de résistance aux tétracyclines est lié à une protéine protectrice du ribosome, appelée tet(M), et découverte la première fois chez *E. coli*. Cette protéine est codée par un transposon de la famille Tn916 et est similaire au facteur d'élongation G. Elle interagit avec le ribosome en diminuant son affinité pour les tétracyclines (33).

Enfin, dans les cas des fluoroquinolones, des gènes transmis par des plasmides, les *qnr* (quinolone resistance), sont à la base d'une résistance intermédiaire chez *P. mirabilis*, *Morganella (M.) morganii* et *Salmonella (S.) enterica* (34-36). Ces gènes produisent des polypeptides qui protègent les ADN gyrases et les topoisomérases, et par conséquent bloquent l'accès aux fluoroquinolones.

1.2.2.4 Surexpression de la cible

Ce mécanisme a été rarement décrit dans la littérature et seulement dans le cas des sulfamides (37). Des isolats de *Haemophilus (H.) influenzae* hautement résistants sont caractérisés par une surexpression de la cible de ces molécules, l'enzyme dihydrofolate réductase (DHR), une enzyme impliquée dans la synthèse de la thymidine. Dans un autre exemple, la surexpression de DHR est due à des mutations dans le promoteur de cette enzyme chez *E. coli*. Le déséquilibre entre la quantité d'antibiotique et la surexpression de sa cible diminue l'efficacité bactéricide de l'antibiotique (38).

Les mécanismes de résistance connus à ce jour sont donc très nombreux et variés en fonction des bactéries et des familles d'antibiotiques. Par opposition, ceux décrits chez les mycoplasmes sont beaucoup moins nombreux. Ils seront détaillés dans la 3^{ème} partie de cette revue.

1.2.3 Détection et détermination du niveau de résistance

La détermination de la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques répond à deux objectifs essentiels : 1) la prédiction de l'effet clinique d'un traitement sur un germe chez un hôte infecté (dans le cadre d'un diagnostic) ou 2) la surveillance épidémiologique des résistances acquises dans une population bactérienne donnée. *In vitro*, plusieurs méthodes quantitatives et de détection de la résistance existent. Dans la suite de cette revue, ces différentes méthodologies seront détaillées.

1.2.3.1 Méthodes de quantification de la sensibilité/ la résistance

Le paramètre le plus utilisé pour évaluer le degré de sensibilité d'un germe à un antibiotique est la détermination de sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette dernière correspond à la plus petite concentration d'antibiotique à partir de laquelle la croissance visible d'une bactérie est inhibée. On mesure donc ici l'effet bactériostatique (*a minima*) d'un antibiotique, ce qui donne une idée approximative de l'effet de l'antibiotique sur le germe *in vivo*. La valeur de la concentration inhibitrice *in vitro* est confirmée par des études pharmaceutiques qui permettent de définir *in vivo* des concentrations critiques des traitements antibiotiques, c'est-à-dire la concentration de la molécule dans les tissus et ensuite l'effet de cette concentration sur le germe. Un autre paramètre, utilisé moins souvent, est la concentration minimale bactéricide (CMB). Il sert à prédire l'activité bactéricide d'une molécule.

Les CMI peuvent être déterminées par des méthodes de diffusion à partir d'un disque, ou d'une bande, imprégnés d'antibiotique déposé sur un milieu gélosé (antibiogramme, E-test) ou par des méthodes de dilutions de l'antibiotique en milieu liquide ou en gélose. Ces méthodes, pour qu'elles soient interprétables, doivent être standardisées avec des concentrations d'antibiotique précises, un inoculum de culture de densité cellulaire maîtrisée et des conditions d'incubation définies (pH, température, humidité ...) (39). Le temps d'incubation pour cette expérience est également critique et dépend de la nature du germe et de ses caractéristiques de croissance. La standardisation des méthodes, réalisée par plusieurs organismes comme le CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute), l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et le CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie), permet la comparaison des résultats entre différents laboratoires. Ainsi, un classement des germes en catégorie sensible, intermédiaire et résistant est réalisable (39). Ce classement se base sur des valeurs critiques, les valeurs seuils déterminées d'un point de vue clinique. Les concentrations critiques des antibiotiques, pour une espèce donnée, sont établies sur la base des concentrations sériques obtenues après administration d'une posologie « usuelle » (concentration critique inférieure, c) et de la posologie maximale tolérée (concentration critique supérieure, C). Selon la SFM (Société Française de Microbiologie), la formule qui permet de calculer c et C inclut le pic sérique, la concentration au bout d'une demi-vie, la concentration après 4h et le taux de liaison aux protéines plasmatiques, l'ensemble de ces paramètres étant calculés après administration de l'antibiotique. De ces données résulte le classement des souches en trois

groupes: sensible quand la CMI de l'isolat d'une espèce est inférieure à la valeur critique basse; 2) intermédiaire quand la CMI de l'isolat est comprise entre la valeur critique basse et la valeur critique haute ; 3) résistante, quand la CMI est supérieure à la valeur critique haute (40). Par ailleurs, le niveau de résistance peut aussi être déterminé d'un point de vue épidémiologique. Des valeurs seuils épidémiologiques spécifiques à une espèce, à un ou plusieurs germes et aussi à un antibiotique donné peuvent être déterminées. Ici on parle de population respectivement sensible ou résistante en fonction du profil de distribution des CMI (40).

1.2.3.1.1 Méthodes de diffusion :

1.2.3.1.1.1 Antibiogramme standard

Sur un milieu gélosé ensemencé avec un inoculum de densité cellulaire connue de la souche à étudier, des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme et connue dans la gélose. Après incubation, des zones circulaires d'inhibition de croissance bactérienne se forment tout autour des disques. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe. Par conséquent, la valeur de CMI peut être déterminée suivant la droite de concordance en se basant sur le diamètre d'inhibition (Figure 4).

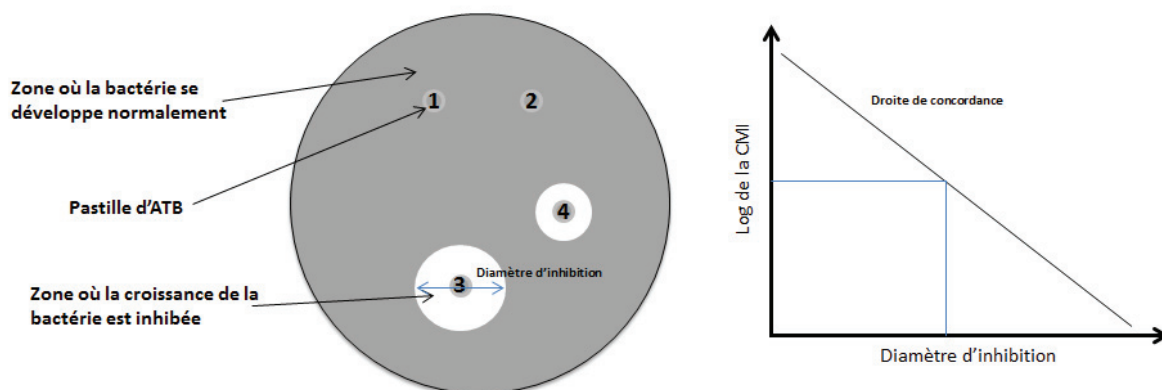


Figure 4 : Antibiogramme et droite de concordance, méthode standard utilisée pour la détermination de CMI

1.2.3.1.1.2 E-test

Cette technique a été mise au point pour rendre la détermination des CMI plus simple et rapide (41). Brièvement, elle consiste à déposer une bandelette d'antibiotique sur une boîte de gélose où un inoculum de souches est préalablement ensemencé. Cette bandelette est imprégnée d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique. La formation d'une ellipse d'inhibition autour de la bandelette permet de déterminer le point d'intersection qui correspond à la valeur de CMI. La limite de cette méthode est que les bandelettes ne se préparent pas en laboratoire (ce qui est aussi vrai pour les disques d'antibiogrammes standards). De plus, les bandelettes E-test commercialisées ne couvrent pas toutes les molécules d'antibiotiques à tester et peu existent pour des molécules strictement vétérinaires.

1.2.3.1.2 Méthodes de dilutions

1.2.3.1.2.1 En milieu gélosé

Pour déterminer la CMI en milieu solide d'une autre façon que celles présentées plus haut, l'antibiotique étudié est incorporé à des concentrations croissantes (selon une progression géométrique de raison 2) dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface des différentes géloses est ensuite ensemencée avec un inoculum calibré des souches (c'est-à-dire ayant fait l'objet d'un dénombrement préalable) (42). Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par la valeur de la plus faible concentration de l'antibiotique entraînant l'inhibition de la croissance visible du germe sur le milieu gélosé (43) (Figure 5).



Figure 5 : Détermination des CMI par dilution en milieu gélosé.

Sept géloses ensemencées avec des isolats cliniques de *S. aureus* et contenant des concentrations croissantes de vancomycine. La valeur de CMI est celle où la croissance visible est inhibée, ici c'est la boîte de CMI 2 µg/mL pour 8 des 11 souches et 4 µg/mL pour les 3 souches restantes (43).

1.2.3.1.2.2 En milieu liquide

Le principe de mesure de la CMI en milieu liquide est le même qu'en milieu gélosé. L'inoculum bactérien calibré est distribué dans une série de tubes de milieu contenant les concentrations croissantes de l'antibiotique. Après incubation, la CMI est déterminée par le tube qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible ou mesurée (densité optique à 600 nm).

1.2.3.2 Méthodes alternatives

1.2.3.2.1 Recherche des facteurs de résistance

Des PCR (Polymerase Chain Reaction) ciblant les gènes de résistance peuvent être réalisées afin de déterminer si l'isolat possède le gène conférant la résistance. Par exemple, l'identification des gènes responsables de la méthylation d'un antibiotique peut donner une indication sur le profil de résistance chez une bactérie (27, 28). D'autre part, il existe dans le cas des β -lactamases une technique pour détecter la présence des enzymes inactivant les β -lactamines. La méthode repose sur l'utilisation d'une céphalosporine changeant de coloration après hydrolyse. La molécule la plus utilisée est la nitrocéfine qui, après action d'une β -lactamase, vire du jaune au rouge (<http://www.oxid.com/fr/printomd.asp?pre=BR0066&l=FR>). Enfin, les puces à ADN (microarrays) sont aussi utilisées pour détecter des germes comme *Salmonella* et *E. coli* portant et exprimant des gènes de résistance, surtout des gènes d'efflux ou des gènes exprimant des enzymes qui dégradent les antibiotiques (44). Par contre, elles ne sont pas souvent utilisées en raison de leur coût élevé. Elles présentent de plus le défaut de ne rechercher que les gènes connus (et pas tous les gènes impliqués dans la résistance), la présence d'un gène n'étant pas une garantie de son expression (44).

1.2.3.2.2 Méthodes basées sur des nouvelles technologies

Il existe des méthodes plus récentes pour déterminer le niveau de résistance et qui se basent sur des technologies modernes utilisant des automates, qui seront ou sont déjà commercialisées par plusieurs compagnies. Parmi ces technologies, on peut citer : le séquençage à haut débit, la spectrométrie de masse et la détermination des CMI par des automates standardisés (45). Par exemple, la microfluidique est une science qui se base sur les écoulements de liquides dans des canaux de taille micrométrique afin d'isoler des micro-unités pour pouvoir les étudier. Parmi les différentes applications de cette science, une chaîne (un canal) d'agarose microfluidique (Microfluidic Agarose Channel, MAC) peut être utilisée

pour déterminer la CMI d'une bactérie. Le système de MAC immobilise des bactéries dans une matrice d'agarose formant des chambres de culture microfluidique (les puits du canal). L'antibiotique est ensuite mis en contact avec les bactéries par diffusion dans un canal différent. La croissance de cellules bactériennes (isolées) est suivie par microscopie tout au long du temps d'incubation. Enfin, les images sont analysées par un programme de traitement d'image pour déterminer des valeurs de CMI. Trois bactéries de référence du CLSI ont été testées avec plusieurs sortes d'antibiotiques et les valeurs de CMI obtenues en 3 heures seulement sont concordantes avec celles déterminées par une méthode de référence par le CLSI (46).

2 Mycoplasmes

Dans la première partie de cette revue, le choix des exemples pour illustrer la résistance bactérienne s'est volontairement porté sur des bactéries autres que les mycoplasmes. Afin d'aborder plus spécifiquement la résistance des mycoplasmes dans la 3ème partie de cette revue bibliographique, nous allons tout d'abord présenter cette famille de bactéries très particulières, qui présente une gamme « limitée » de mécanismes de résistance aux antibiotiques.

2.1 Historique

Les mycoplasmes sont les plus petits microorganismes vivants capables de se répliquer en milieu axénique. Découverts à la fin du XIXème siècle (1898), ils étaient alors considérés comme des virus. En effet, ils sont de taille extrêmement petite et ont la particularité d'être ultra-filtrables, c'est-à-dire qu'ils passent à travers le filtre classique à 0,22 µm, arrêtant les bactéries classiques à parois. Edmond Nocard et Emile Roux sont les premiers scientifiques parvenus à cultiver le mycoplasme responsable de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB). Au début du XXème siècle, les mycoplasmes furent définitivement assimilés à des bactéries parce qu'ils possèdent de l'ADN, qu'ils ont une activité métabolique propre et qu'ils peuvent être cultivés sur des milieux acellulaires. Cependant l'absence de paroi les distingue des autres bactéries : les mycoplasmes appartiennent donc à la classe des *Mollicutes* qui signifie en latin « peau souple » (Figure 6) (47, 48).

2.2 Classification

Les *Mollicutes* constituent un groupe phylogénétique homogène dérivé des bactéries à Gram+ à faible teneur en G+C (Guanine et Cytosine) de type *Bacillus* et *Clostridium*, leurs plus proches voisins en phylogénie (49). Le terme « mycoplasme » est utilisé trivialement pour désigner l'ensemble des organismes appartenant à la classe des *Mollicutes*. Cette classe comporte quatre ordres (Figure 6, colonne de droite) : 1) *Mycoplasmatales*, 2) *Entomoplasmatales*, 3) *Acholeplasmatales* et 4) *Anaeroplasmatales*. L'ordre des *Mycoplasmatales* comprend une seule famille, celle des *Mycoplasmataceae*. Cette famille, qui

est caractérisée par son exigence en stérols, est constituée de deux genres : *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. Le genre *Mycoplasma* comprend 107 espèces et sous-espèces à ce jour (50).

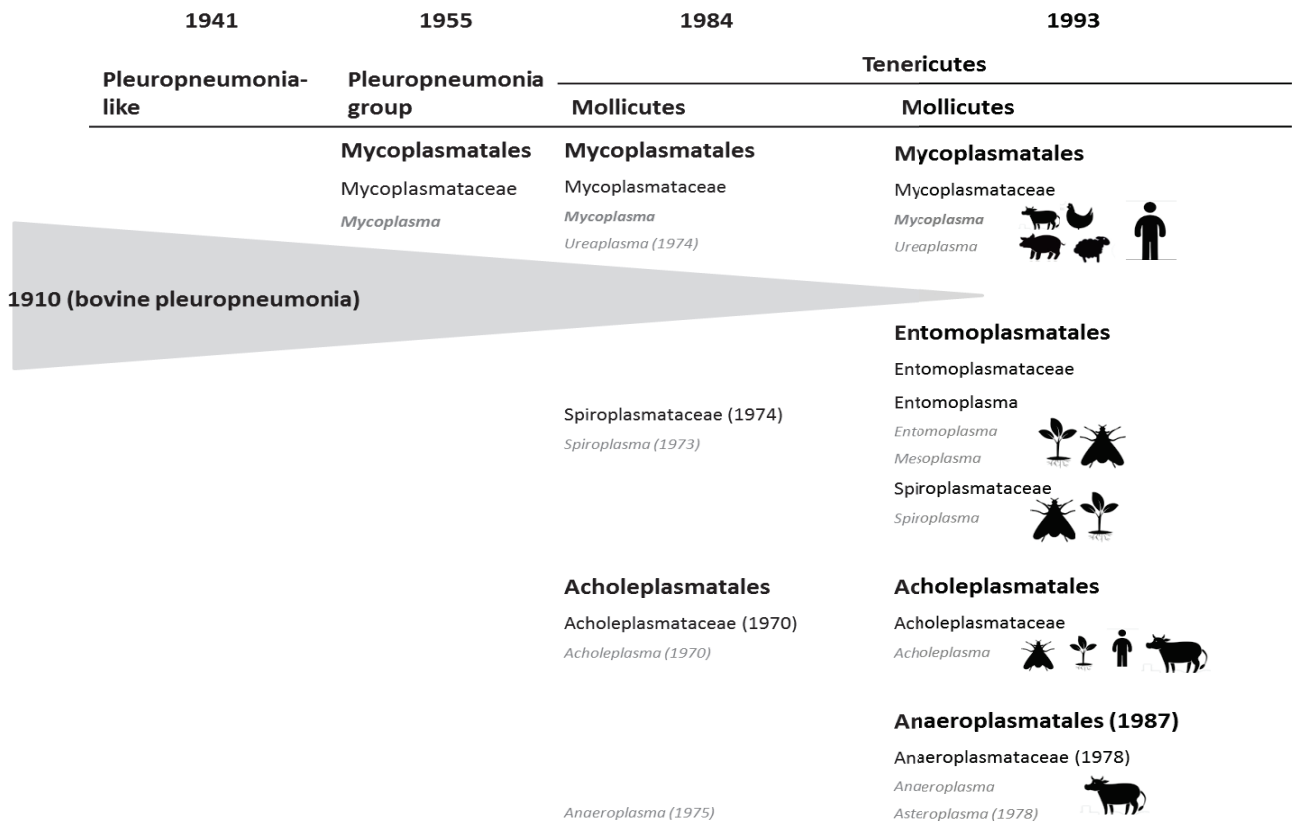


Figure 6 : Historique de la découverte des mycoplasmes : Des « bactéries virus-like » au genre *Mycoplasma*. (47)

Classification des mollicutes avec les différents hôtes : Animaux , Hommes , Insectes , Plantes , Ruminants 

Les mycoplasmes colonisent plusieurs hôtes animaux et humains (pictogrammes de la Figure 6) et causent des maladies diverses. Par exemple, *Mycoplasma* (*M.*) *hominis* est une espèce opportuniste qui se retrouve, en tant qu'agent commensal, dans le tractus uro-génital inférieur des femmes. Parfois, il peut causer des infections urogénitales. Chez les nouveau-nés, il peut également causer une pneumonie, une méningite ou des abcès. Il a été également impliqué dans des infections extra-génitales, en particulier chez les patients immunodéprimés

(51). *M. pneumoniae* est un autre exemple d'agent pathogène à l'origine de pneumopathies chez les enfants. Il peut aussi causer des troubles respiratoires chez les jeunes adultes (52). Chez les animaux, beaucoup d'espèces ont aussi été isolées et décrites, comme *M. agalactiae* chez les ovins et les caprins (responsable d'arthrites, de mammites, de pneumonies...), *M. gallisepticum* chez les volailles (maladies respiratoires chroniques, sinusites...) et *M. bovis* chez les bovins (impliqué dans des bronchopneumonies, des mammites...). Il existe aussi quelques espèces commensales des petits ruminants régulièrement isolées en portage asymptomatique, par exemple dans le conduit externe de l'oreille *M. cottewii* et *M. yeatsii* chez les caprins.

L'histoire évolutive des mycoplasmes et les relations entre espèces peuvent être décrites grâce à la phylogénie moléculaire. Cette science se base sur l'analyse du polymorphisme de séquences de gènes universellement conservés chez les organismes vivants. Ainsi, la séquence de l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (ARNr 16S) est classiquement utilisée pour construire les arbres phylogénétiques représentant ainsi un outil taxonomique et diagnostique largement répandu. Un arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16S a été construit pour observer les liens phylogéniques entre les mycoplasmes. L'analyse de ce dernier a permis de diviser les mycoplasmes en 4 groupes phylogénétiques : *Spiroplasma*, *Hominis*, *Pneumoniae* et le groupe *Phytoplasma / Acholeplasma* (Figure 7) (53).

2.3 Caractéristiques des mycoplasmes

Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi et de petite taille cellulaire (0,15 à 0,8 µm). Cette absence de paroi leur procure une certaine plasticité cellulaire : il existe des formes allongées, fusiformes ou filamenteuses. Leur membrane cytoplasmique constitue la seule interface avec leur environnement, d'où leur sensibilité à la chaleur, aux ultraviolets ou aux détergents. Les mycoplasmes sont comparativement plus résistants à des températures froides qu'à des températures plus chaudes dans le milieu extérieur (54).

Le génome des mycoplasmes varie en taille de 580 à 1300 kpb selon l'espèce et comporte entre 400 et 1400 gènes. Depuis 1995, date du premier séquençage de génome de mycoplasme (*M. genitalium* (55)), 76 génomes appartenant à 51 espèces ont été séquencés et déposés dans la base de données Molligen (<http://www.molligen.org>) (56). Le génome mycoplasmatique, le plus petit des génomes de cellules procaryotes, est constitué d'un ADN circulaire à double brin avec une faible teneur en bases G+C (23 à 41% pour *Mycoplasma* et 27 à 30% pour *Ureaplasma*). Ce faible pourcentage en G+C a entraîné chez les mycoplasmes

un changement dans l'usage du codon UGA (stop dans le code universel) qui est utilisé comme un codon Tryptophane (Trp) (57).

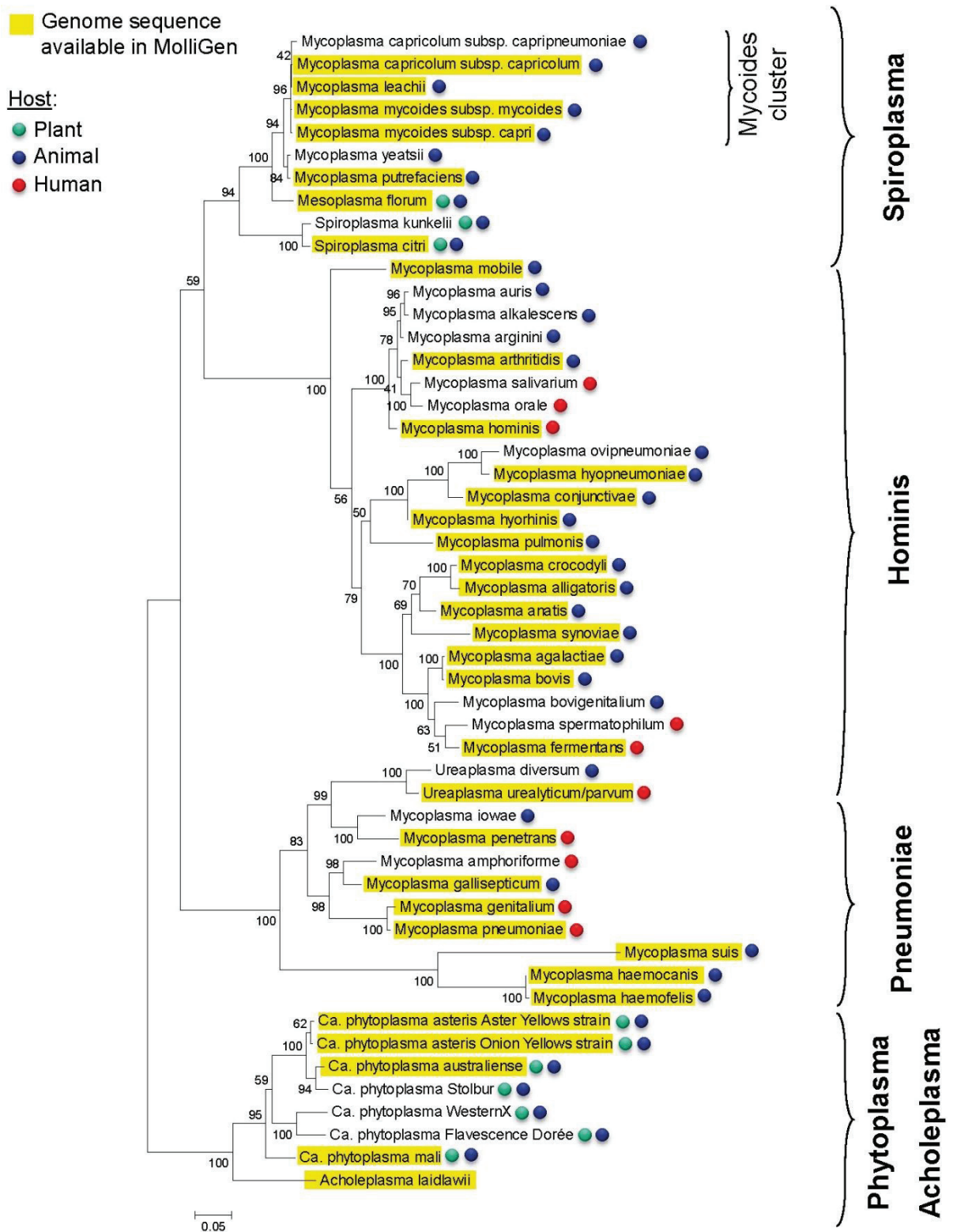


Figure 7 : Classification phylogénétique des mycoplasmes basée sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S (<http://www.molliGen.org>)

La plupart des mycoplasmes sont anaérobies facultatifs. Leur croissance est lente comparée aux autres bactéries, avec un temps de génération de 1 à 6 heures à l'exception d'une nouvelle espèce *M. feriruminatoris* sp. nov. décrite récemment et dont le temps de génération est inférieur à 30 minutes (58). Les mycoplasmes sont facilement reconnaissables sur boîte de culture grâce à leur aspect typique et commun à la plupart des espèces, en « œufs sur le plat », comme le montre la figure 8.

La petite taille du génome mycoplasmiq ue résulte d'une évolution par perte successive de différents gènes, comme ceux utilisés pour la synthèse de la paroi et d'autres codant la synthèse d'acides aminés et de cofacteurs. Cette capacité de biosynthèse limitée fait du mycoplasme un micro-organisme exigeant en nutriments lors de sa culture *in vitro*. Les sources d'énergie utilisées par les mycoplasmes sont différentes suivant les espèces. Par exemple, *M. pneumoniae* utilise le glucose, *M. hominis* l'arginine et *Ureaplasma urealyticum* l'urée. Des milieux de composition riche et complexe sont nécessaires pour permettre leur développement (milieux avec extraits de levure, sérum, cholestérol, de l'ADN bactérien ...). La difficulté de cultiver les mycoplasmes *in vitro* a longtemps été et est encore aujourd'hui un frein au développement d'outils moléculaires et biochimiques nécessaires pour la caractérisation et l'étude de ces bactéries.



Figure 8 : Colonies de *M. bovis* (souche 1067) sur milieu gélosé, observées sous loupe binoculaire (x50).

2.4 Les mycoplasmoses des ruminants- Focus sur les mycoplasmoses à *M. bovis*

Les mycoplasmoses des ruminants sont des maladies associées à des signes cliniques très variés et qui affectent différents organes. Parmi celles-ci, quatre maladies se distinguent particulièrement pour des raisons réglementaires et/ou de sévérité. Il s'agit de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB), la pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC), l'agalactie contagieuse (AC) et les bronchopneumonies infectieuses enzootiques (BPIE). La

liste des mycoplasmes des ruminants et les maladies associées se trouvent dans le Tableau 3 (59).

La PPCB, la PPCC et l'AC sont des maladies contagieuses à déclaration obligatoire à fort impact économique et sanitaire et de ce fait, sont inscrites sur la liste de l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale). Par contre, et malgré l'incidence grandissante des BPIE à *M. bovis* en France, cette maladie n'a pas été classée parmi les dangers sanitaires de première et deuxième catégories pour les espèces animales dans la législation française. Pourtant, le coût des troubles respiratoires représente une part importante du revenu des exploitations et le traitement des BPIE à *M. bovis* devient très problématique en raison de l'émergence récente de souches multi-résistantes dans le monde (60-63).

Dans la suite de cette partie, seules les BPIE à *M. bovis* seront présentées.

2.4.1 Caractéristiques

Génétiquement très proche de *M. agalactiae* responsable d'affections chez les petits ruminants, *M. bovis* fait partie du groupe phylogénétique *Hominis* et est considéré comme une espèce à part entière depuis 1976 (64). Ses caractéristiques morphologiques et culturelles sont identiques à celles des autres mycoplasmes, décrites dans la partie précédente. Les conditions optimales de survie de *M. bovis* dans le milieu extérieur sont réunies pour un intervalle de températures comprises entre 20 et 28°C. *M. bovis* est un des mycoplasmes des ruminants les plus étudiés, étant impliqué dans plusieurs affections avec des conséquences économiques importantes (65). La première souche de *M. bovis* entièrement séquencée en 2011 est PG45^T, isolée aux USA à partir d'un cas de mammite en 1962. Cette souche est devenue la souche de référence de l'espèce *M. bovis*. Son génome, comprend 1003,4 kpb avec 766 gènes, 61 pseudo-gènes et 29,3% de teneur en G+C (66). Jusqu'à présent, quatre autres génomes de *M. bovis* ont été séquencés, correspondant à deux souches chinoises (67, 68) et deux françaises pas encore publiés (projet ANR, EVOLMYCO, pour lequel l'UMR est partenaire).

Plusieurs maladies dues à *M. bovis* sont observées chez les bovins, comme les mammites, les arthrites, les otites et les BPIE. Par exemple, aux Etats-Unis en Suisse et en Italie, les infections à *M. bovis* sont majoritairement des mammites (69-72). Par contre, en France, *M. bovis*, est majoritairement impliqué dans le syndrome des BPIE chez les jeunes bovins.

Tableau 3 : Les mycoplasmes pathogènes chez les ruminants

Agent	Hôte	Signes cliniques ou syndrome	Groupe Phylogénétique
<i>M. bovis</i>	Bovins	Bronchopneumonies infectieuses enzootiques (BPIE), mammites, arthrites et otites	<i>Hominis</i>
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	Bovins	Péripneumonie Contagieuse Bovine (PPCB)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	Petits ruminants	Pleuropneumonie Contagieuse Caprine (PPCC)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	Petits ruminants	Agalactie Contagieuse (AC)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	Petits ruminants	Agalactie Contagieuse (AC)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. putrefaciens</i>	Petits ruminants	Agalactie Contagieuse (AC)	<i>Spiroplasma</i>
<i>M. agalactiae</i>	Petits ruminants	Agalactie Contagieuse (AC)	<i>Hominis</i>

Pour bien comprendre la place de *M. bovis* dans les BPIE, il est impératif de donner quelques détails sur ces maladies multifactorielles.

2.4.2 Implication de *M. bovis* dans les bronchopneumonies infectieuses enzootiques (BPIE)

2.4.2.1 Étiologie et signes cliniques

Les BPIE sont un syndrome infectieux multifactoriel c'est-à-dire provoqué par différents agents pathogènes. Elles sont de plus exacerbées par divers facteurs: les conditions de vie de l'animal (l'humidité, la température et la ventilation des étables, la taille, la densité et la composition des lots d'animaux...), le statut immunitaire des animaux et le stress. Ces facteurs de risque jouent un rôle extrêmement important dans la survenue et la propagation de la maladie.

Les signes cliniques des BPIE sont multiples : les animaux ont de la fièvre, sont abattus et mangent moins. Ils souffrent de toux, peuvent également présenter des écoulements nasaux muqueux ou purulents et dans les cas les plus graves, avoir des difficultés respiratoires importantes (73). Le diagnostic de ces affections repose en premier lieu sur les signes cliniques. Il est relativement simple à établir et guidera le traitement par la suite. Il consiste donc à distinguer les animaux malades des autres prédisposés mais non encore atteints, pour ensuite choisir un traitement antibiotique adapté à chaque groupe. A noter que dans le cas d'un diagnostic avéré de BPIE, des mesures préventives, hygiéniques, sanitaires ou médicales sont indispensables à mettre en place pour éviter la propagation de la maladie.

Différents agents pathogènes, viraux ou bactériens, sont impliqués dans les BPIE. Les agents viraux en cause sont : le virus de la Rhinotrachéite Infectieuse (BHV-1), le Virus Respiratoire Syncytial (BRSV), le virus ParaInfluenza de type 3 (PI3), le virus de la BVD et le Coronavirus bovin, et ceux bactériens sont les *Pasteurellaceae* (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*...) et les mycoplasmes (*M. bovis*). Les cas de co-infections virus/bactéries ou bactéries/bactéries sont très fréquents (65, 73).

M. bovis est considéré comme un élément prédisposant à l'infection par d'autres agents responsables de BPIE, en fragilisant les poumons par une inflammation chronique. Sa présence coïncide avec une aggravation des signes cliniques et des lésions (73). Bien que *M. bovis* soit l'espèce de mycoplasmes la plus représentée lors d'affections respiratoires chez les bovins, les affections mixtes ne sont pas rares. De ce fait, plusieurs mycoplasmes, comme

M. bovirhinis et *M. canis*, ont été isolés dans des cas de pneumonies chez les bovins, associés à *M. bovis* (59).

2.4.2.2 Prévention

La vaccination est un des moyens de lutte contre les BPIE. Toutefois, leur étiologie multiple complique la validation clinique de l'efficacité des vaccins et les conditions environnementales des essais cliniques ne sont pas toujours maîtrisées. Les essais cliniques sur les troupeaux sont coûteux et peu représentatifs vu le nombre restreint d'animaux testés. Une multiplication des essais cliniques est nécessaire pour pouvoir apprécier l'efficacité d'un vaccin *in vivo*. Il existe en France des vaccins à visée respiratoire validés contre les Pasteurelles, le RSV, le virus PI3, le BVDV, le BHV-1. Par contre, il n'existe actuellement aucun vaccin contre *M. bovis* disponible en France. Aux États-Unis, plusieurs vaccins sont commercialisés pour la prévention des infections respiratoires à *M. bovis* (65).

Jusqu'à présent, la vaccination contre *M. bovis* n'a pas montré d'efficacité avérée en conditions non contrôlées telles que rencontrées sur le terrain (65). La particularité des souches de *M. bovis* rajoute d'autres contraintes par rapport à une approche vaccinale. *M. bovis* possède la capacité de modifier la composition et l'architecture de sa membrane (74). Cette variabilité antigénique se caractérise par des modifications rapides, spontanées et réversibles des protéines exposées à la surface du mycoplasme permettant de maintenir en permanence une population phénotypique hétérogène. Grâce à ce système, les mycoplasmes arrivent à échapper au système immunitaire de leur hôte. Par conséquent, et jusqu'à présent, aucun essai clinique d'un vaccin contre *M. bovis* n'a été concluant en raison de la non-maîtrise des réponses immunitaires des bovins vis-à-vis de cette espèce et des différentes réactions des animaux vis-à-vis des vaccins (75).

La prévention sanitaire reste donc le seul moyen efficace pour éviter les BPIE, notamment celles dues à *M. bovis*. De nombreuses mesures préventives peuvent alors être prises pour éviter la propagation des infections respiratoires : 1) Séparer les animaux de classes d'âge différentes (avec l'âge, les animaux peuvent devenir plus résistants à certains germes, mais ils peuvent toujours contaminer les plus jeunes), 2) Prévoir une quarantaine lors de l'achat des animaux avant de les mélanger avec d'autres animaux déjà présents dans l'élevage, 3) Isoler les animaux malades et 4) Éviter les lots trop grands qui peuvent provoquer du stress ainsi qu'un contact trop étroit et donc une transmission plus importante et rapide des agents pathogènes.

2.4.2.3 Traitement des BPIE

Le diagnostic clinique du syndrome étant relativement facile à établir, le traitement prescrit vient la plupart du temps en amont de l'identification de l'agent pathogène en cause. La prise en charge des maladies respiratoires repose essentiellement sur la prescription d'anti-inflammatoires et une antibiothérapie (59, 73). Les traitements antibiotiques de première intention, non ciblés, comportent un risque d'échec important. Pour qu'il soit efficace, le traitement antibiotique doit être très précoce et mis en place pendant au moins cinq jours. Différentes molécules d'antibiotiques peuvent être administrées aux animaux malades par voie orale ou par injection intramusculaire ou intraveineuse en fonction de leurs caractéristiques pharmacocinétiques. Les principales familles d'antibiotiques utilisables, c'est-à-dire ayant une bonne diffusion pulmonaire (extra- et intracellulaire), sont les β -lactamines et céphalosporines, les tétracyclines, les macrolides, les phénicolés et les quinolones. Pour rappel, les mycoplasmes sont insensibles aux β -lactamines.

Les phénicolés sont largement utilisés en médecine vétérinaire pour traiter les BPIE en raison de leur large spectre d'action et leur bonne diffusion tissulaire. Jusqu'à présent, ces molécules restent efficaces avec des valeurs des CMI peu élevées (1, 76).

En raison d'effets secondaires minimes et de leur coût peu excessif, les tétracyclines ont été largement prescrites et utilisées en médecine vétérinaire au cours du 20^{ème} siècle (77). Elles sont capables de pénétrer les cellules eucaryotes et donc sont utilisées contre les bactéries intracellulaires. Leur large prescription est due aussi à leur spectre d'action qui comporte des germes Gram⁺ et des Gram⁻ ainsi que des germes atypiques comme les *Chlamydiae* et les mycoplasmes (77). Par conséquent, elles sont utilisées pour traiter des infections générales et parfois des mammites. Elles sont également utilisées en prophylaxie et dans certains pays, comme les Etats-Unis, elles sont données aux animaux comme compléments alimentaires pour favoriser leur croissance. Elles sont restées longtemps efficaces contre *M. bovis* (78). Cependant, la grande majorité de souches actuelles de *M. bovis* testées *in vitro* est devenue résistante (1, 61). Les tétracyclines ne sont donc plus considérées comme des molécules de choix dans la lutte contre les mycoplasmes.

Les macrolides sont parmi les premières molécules à être prescrites dans le cas des BPIE (77). Du fait de leur grande liposolubilité, elles ont une bonne diffusion tissulaire et une bonne persistance dans les différents types cellulaires. La prescription des macrolides se fait dans deux cadres : à titre préventif ou en traitement d'une maladie infectieuse. Ces molécules

sont prescrites pour traiter des maladies respiratoires (BPIE), des mammites et aussi des troubles digestifs chez les bovins. Elles sont réputées efficaces contre un grand nombre d'agents microbiens comme les entérobactéries, les staphylocoques, les chlamydias et les mycoplasmes. Parmi ces molécules, la tylosine (TYL), un antibiotique naturel, et la tilmicosine (TILM), semi-synthétique dérivée de la TYL, sont des molécules à 16 chaînons prescrits généralement contre les maladies respiratoires à *M. bovis* (79). Les deux molécules sont administrées par voie injectable, et souvent utilisées en prévention. Ces deux macrolides sont les deux molécules étudiées dans la suite du présent travail. Malgré l'émergence d'isolats cliniques résistants aux macrolides *in vitro* (1) qui remet en cause l'efficacité de ces molécules dans le traitement des BPIE, les résultats des traitements *in vivo* restent satisfaisants, d'autant plus que les macrolides ciblent aussi d'autres agents intervenant dans les affections respiratoires, notamment les pasteurelles et *Histophilus* (76).

Les quinolones sont prescrites contre un large spectre de bactéries y compris les mycoplasmes. En médecine vétérinaire, elles sont prescrites contre les mammites, les conjonctivites, les otites et aussi les pneumonies à mycoplasmes (80). Elles sont largement utilisées grâce à leur diffusion tissulaire et leur temps de demi-vie plasmatique qui varie entre 24 et 48h. Par contre, et contrairement aux macrolides ou tétracyclines, les fluoroquinolones de 3^{ème} génération comme l'enrofloxacin, la danofloxacin et la marbofloxacin ne sont pas utilisées en prévention ou en métaphylaxie (81, 82). L'ensemble des souches isolées de *M. bovis* en France reste sensible aux trois molécules de fluoroquinolones utilisées en médecine vétérinaire : l'enrofloxacin avec de très bons résultats *in vitro* (1, 83) et sur le terrain, la danofloxacin et la marbofloxacin. A l'heure actuelle, ces deux dernières molécules, plus récentes, restent efficaces en l'absence de résistance chez les mycoplasmes (1, 84).

2.4.2.4 Recherche spécifique de *M. bovis* comme agent étiologique des BPIE

Suite à un diagnostic clinique de BPIE, le vétérinaire peut effectuer des prélèvements sur l'animal malade et envoyer l'échantillon au laboratoire d'analyses pour la recherche d'agents pathogènes (mycoplasmes, pasteurelles ou virus).

Les laboratoires utilisent différentes techniques pour mettre en évidence les agents pathogènes suspectés. Les techniques de biologie moléculaire, telles que les PCR (classique ou en temps réel) sont les plus utilisées.

Les isolats de mycoplasmes peuvent quant à eux être identifiés par plusieurs méthodes. Celle utilisée majoritairement en France est un test immunologique basé sur la détection des antigènes de surface à l'aide d'anticorps spécifiques d'espèces, le MF-dot (membrane filtration) (85, 86). Cette méthode n'est cependant pas utilisable par tous les laboratoires de manière décentralisée puisque qu'un savoir-faire et des réactifs spécifiques (les antisérums), produits à façon, sont nécessaires. Le MF-dot est utilisé en routine dans notre laboratoire pour l'identification des mycoplasmes dans le cadre du réseau VIGIMYC, réseau national d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses des ruminants, mis en place depuis 2003 au laboratoire de Lyon. Il a comme missions d'assurer l'épidémiologie-surveillance des mycoplasmes circulant en France et de détecter l'émergence ou la réémergence de certaines espèces (87, 88). Le fonctionnement du réseau VIGIMYC repose sur un échange de services et d'informations entre l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) d'un côté et les laboratoires départementaux de l'autre côté. En pratique, lorsqu'un vétérinaire soupçonne la présence d'un mycoplasme, il effectue un prélèvement pour lequel il va demander la recherche de mycoplasmes à l'un des laboratoires. Chaque échantillon est accompagné de commémoratifs détaillés sur le cas clinique. Si un mycoplasme est isolé, le laboratoire envoie l'isolat à l'Anses-Lyon pour une identification précise de la souche, indispensable en raison de l'existence d'espèces apathogènes. Après identification de l'espèce, la réponse est rendue ensuite au vétérinaire et l'Anses conserve en contrepartie l'isolat dans sa collection de souches.

En dehors de VIGIMYC, d'autres méthodes d'identifications plus classiques de *M. bovis* existent. Elles reposent sur une amplification spécifique par PCR amplifiant une partie du gène de l'ADN polymérase C (*PolC*) (89), de la nucléase *uvrC*(90), l'oligopeptide perméase *oppD/A* (91) ou l'ADNr 16S (92). De plus, l'identification de *M. bovis* peut se faire par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, méthode qui se base sur la comparaison des spectres de références pour différencier les espèces (93). Des kits de QPCR commercialisés sont aussi utilisés pour l'identification de *M. bovis* (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/MPBO50>) Enfin, un test biochimique peut révéler la présence de *M. bovis*. Le pyruvate, métabolite produit par la bactérie, le mycoplasme provoque une diminution du pH du milieu et un virage de l'indicateur (rouge de phénol) du rouge à l'orange-jaune.

2.4.2.5 Epidémiologie-surveillance de *M. bovis*

L'épidémiologie-surveillance, grâce aux techniques diagnostiques de plus en plus robustes, contribue au contrôle des mycoplasmoses. Elle est un outil majeur dans la collecte des données concernant la propagation des maladies, la prévalence des différentes espèces, la diversité des souches sur le terrain et l'émergence de nouvelles espèces.

En France, le réseau VIGIMYC permet à l'Anses de disposer d'une grande collection de mycoplasmes isolés à partir des cas cliniques. Cette collection alimente les travaux de recherches du laboratoire notamment pour le sous-typage des isolats et plus récemment pour la caractérisation de la résistance aux antibiotiques.

Le sous-typage permet de déterminer la clonalité de deux isolats ou de tracer l'histoire évolutive d'une souche de mycoplasme. Ce sous-typage est réalisable suivant plusieurs méthodes comme la PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis), le MLST (Multi Locus Sequence Typing), la MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis), la spectrométrie de masse à MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) ou encore le séquençage des génomes. Le principe de la PFGE repose sur une migration par électrophorèse en champ pulsé d'ADN génomique digéré par des enzymes de restriction. Suivant les profils obtenus après migration, les clones peuvent être classés. Cette méthode est caractérisée par un pouvoir discriminant important, une grande résolution et une bonne reproductibilité intra-laboratoire (94). La technique de MLST repose sur le séquençage et l'analyse des séquences de plusieurs gènes de ménage, hautement conservés au sein de la même espèce. Cette méthode, tout comme la MLVA, qui repose sur l'analyse des profils des VNTR (Variable Number Tandem Repeats) – régions courtes dupliquées en nombre variable selon les souches et selon les loci, est largement utilisée dans la discrimination et la classification des souches de *M. bovis* (95-98). La spectrométrie de masse type MALDI-ToF peut être aussi utilisée pour comparer des isolats suivant leur profil protéique (95). A noter aussi que le séquençage total des génomes devient de plus en plus utilisé, grâce à une baisse de coût sur les dernières années. Néanmoins, cet outil est moins facile à utiliser en routine et présente un temps de traitement de données important. Il nécessite de plus de bonnes gestion et maîtrise de l'analyse des séquences, de leur assemblage et de l'annotation du génome séquencé (99).

Même si le sous-typage moléculaire des souches reste un des moyens le plus utilisé pour surveiller l'évolution d'une espèce, la détermination du niveau de résistance et des mécanismes moléculaires sous-tendant ce phénotype est un autre moyen de classification des

isolats. Ces mécanismes n'ont, jusqu'à présent, jamais été étudiés pour les isolats français de *M. bovis*.

3 Antibiotiques et mycoplasmes

Parmi l'ensemble des mécanismes de résistance très variés décrits dans le chapitre 1, peu ont été identifiés chez les mycoplasmes.

En l'absence de paroi, les mycoplasmes sont insensibles aux antibiotiques qui inhibent l'élaboration de la paroi bactérienne, comme les β -lactamines (dérivés de la pénicilline, céphalosporines) et les antibiotiques polypeptidiques (polymyxine, bacitracine). Par contre, ils sont réputés être sensibles aux tétracyclines - qui interrompent les transferts d'acides aminés dans les complexes ribosomiques, empêchant la croissance des chaînes peptidiques, aux macrolides et lincosamides – qui inhibent la synthèse protéique – et enfin aux pleuromutilines, aux aminosides et aux quinolones et fluoroquinolones – qui affectent l'activité de l'ADN-gyrase (tableau 4).

Les antibiogrammes classiques ne sont pas utilisables pour déterminer le niveau de résistance des souches de mycoplasmes à cause de leur croissance lente et exigeante (milieu de cultures complexes). Par conséquent, seules les méthodes de détermination des CMI par dilution sont applicables. Ces méthodes sont actuellement peu standardisées pour les mycoplasmes, ce qui rend difficile la comparaison des résultats. Depuis 2000, des recommandations et des lignes directives ont été établies afin de limiter cette variabilité (42).

Dans la suite de cette revue bibliographique, seules trois familles d'antibiotiques utilisées pour le traitement des BPIE seront abordées (77) : les tétracyclines, les macrolides et les fluoroquinolones. Leur mode d'action ainsi que leur spectre d'activité et l'émergence de la résistance seront détaillées.

Tableau 4 : Caractéristiques de trois familles d'antibiotiques utilisées chez les bovins et décrites dans cette étude. Les molécules en gras sont celles étudiées au cours de la thèse

Familles	Molécules	Effet	Cible
Macrolides	Erythromycine, spiramycine, gamithromycine, tulathromycine, tylosine, tilmicosine	Bactériostatique	Ribosome
Tétracyclines	Oxytétracycline , chlortétracycline	Bactériostatique	Ribosome
Quinolones	Acides nalidixique et oxolinique (1 ^{ère} génération) Fluméquine (2 ^{ème} génération) Enro-, dano-, marbo- , difloxacin (3 ^{ème} génération)	Bactéricide	Gyrase et topoisomérase

3.1 Les tétracyclines

3.1.1 Définition

Les tétracyclines sont des molécules naturelles (la chlortétracycline est produite par les *Streptomyces*) ou semi-synthétiques. Les tétracyclines, comme leur nom l'indique, possèdent une structure à 4 cycles hydrophobes sur laquelle viennent se greffer différents résidus. Leur hydrophobicité peut varier donc en fonction de la nature des résidus. Découvertes pour la première fois dans les années 40, l'oxytétracycline et la chlortétracycline, des molécules naturelles, ont été les premières à être commercialisées en 1948. Les molécules semi-synthétiques sont par contre arrivées plus tard sur le marché, dans les années 60, comme la doxycycline et la méthacycline (100).

3.1.2 Mode d'action

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques, qui stoppent la croissance bactérienne en inhibant la synthèse protéique. La cible de ces molécules est l'ARNr 16S qui est un des composants de la sous-unité 30S du ribosome. Les molécules de tétracyclines se fixent à la place de l'ARNt sur le site A du ribosome, plus précisément dans la poche formée par les résidus 1196-1200 :1053-1056* de l'hélice H34 et les résidus 964-967 de l'hélice H31 de l'ARNr 16S qui compose la sous-unité 30S du ribosome (Figure 9) (101). Cette fixation bloque l'élongation et la traduction est donc interrompue (100).

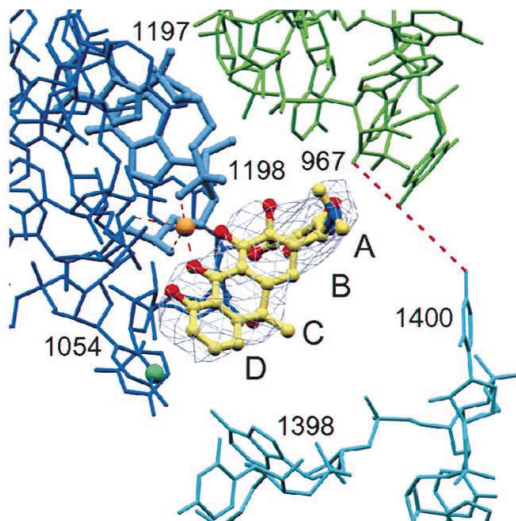


Figure 9 : Représentation de l'interaction entre la tétracycline composée de 4 cycles A, B, C et D (en jaune) et les résidus H34 (1196-1200 :1053-1056) et H31 (964-967) de l'ARNr 16S (101).

* Les positions des nucléotides seront données dans toute l'étude, sauf contre-indication, chez *E. coli* afin que les différentes études citées soient comparables.

3.1.3 Etat des lieux de la résistance chez les mycoplasmes

Le niveau de résistance aux tétracyclines chez les mycoplasmes, qu'ils soient humains comme *M. hominis* et *M. pneumoniae* ou animaux comme *M. bovis*, *M. bovirhinis* et *M. gallisepticum*, reste assez variable (102, 103). Les CMI déterminées *in vitro* montrent une perte de sensibilité des souches de *M. hominis* et *Ureaplasma spp* par exemple. Les isolats de ces espèces sont résistants aux tétracyclines avec des valeurs de CMI supérieures ou égales à 8 µg/mL. Chez *M. pneumoniae*, la résistance aux tétracyclines n'a jamais été décrite *in vivo* (103). Par contre *in vitro*, des mutants de *M. pneumoniae* ayant des valeurs de CMI de 2 µg/mL ont pu être sélectionnés.

La résistance aux tétracyclines repose sur deux mécanismes majeurs : la modification de la cible, ici c'est l'ARNr 16S, et la protection du ribosome par la protéine Tet(M) codée par un transposon de la famille Tn916 (tableau 5).

La résistance aux tétracyclines chez *M. hominis* et *Ureaplasma spp* est associée à la présence de la protéine Tet(M) et parfois à des modifications dans l'ARNr 16S (103-105). Cette résistance a été retrouvée chez des isolats cliniques ainsi que chez des mutants *in vitro*. Les mutations retrouvées dans l'ARNr 16S réduisent l'affinité des tétracyclines avec le ribosome (106). Ce mécanisme est celui le plus répandu et décrit chez les mycoplasmes. Des positions clés ont été définies comme responsables de la perte de sensibilité des mycoplasmes aux tétracyclines. De plus, une corrélation entre le nombre d'allèles mutés (plusieurs copies du 16S) et les valeurs des CMI des tétracyclines a été démontrée chez *M. bovis* (107). D'autre part, la protéine Tet(M) n'a été détectée que chez *M. hominis* et *Ureaplasma spp* mais jamais chez *M. pneumoniae* ou *M. bovis* (tableau 5) (105).

Chez *M. bovis*, la sensibilité aux tétracyclines varie suivant les pays. Plusieurs études d'antibiosensibilité ont montré une augmentation dans les valeurs des CMI₅₀ (c.à.d. la valeur de CMI de 50% de la population). Dans plusieurs pays européens comme l'Angleterre, les Pays Bas et la Hongrie, les valeurs des CMI₅₀ de l'oxytétracycline sont supérieures à 8 µg/mL (60, 61, 98, 108), alors qu'en Belgique par exemple, les valeurs restent inférieures à 8 µg/mL (109). Ailleurs dans le monde, les résultats de CMI sont aussi hétérogènes et varient entre 2 et 16 µg/mL (63, 110).

En France, une étude récente réalisée en 2013 sur deux ensembles de souches isolées entre 1978 et 1979 d'une part et 2009 et 2012 d'autre part, a montré que l'émergence de la résistance n'est pas un phénomène récent puisque d'anciens isolats avaient déjà des CMI

élevées supérieures à 16 µg/mL (1). Cette perte de sensibilité, chez des souches isolées dans la fin des années 1970, n'est pas surprenante puisque les tétracyclines font partie des premières familles d'antibiotiques mises sur le marché (fin des années 1940). En l'absence des valeurs seuils qui définissent la résistance chez les mycoplasmes animaux, la classification des souches s'était faite dans cette étude sur la base des valeurs seuils d'une autre famille de bactéries impliquées dans les BPIE, les *Pasteurellaceae*.

Le mécanisme à la base de la perte de sensibilité chez *M. bovis* aux tétracyclines a été recherché dans une étude publiée en 2015 (107). Cette étude a montré que la double mutation sur les positions 965 et 967 des deux copies de l'ARNr 16S est corrélée avec l'augmentation des valeurs de CMI (107).

Tableau 5 : Résistance acquise aux tétracyclines chez les mycoplasmes.

Les valeurs entre les deux crochets correspondent à l'étendue des CMI mesurées. *In vivo* fait référence à des isolats cliniques par opposition à « *in vitro* » qui fait référence à des mutants dérivés d'isolats cliniques *in vitro*.

Espèces	Mécanismes	Etude	Positions	CMI µg/mL	Référence
<i>M. pneumoniae</i>	Mutations dans l'ARNr 16S	<i>In vitro</i>	968, 1193	2	103
<i>M. hominis</i>	Mutations dans l'ARNr 16S + <i>tet(M)</i>	<i>In vivo</i>	364, 965, 966, 967, 1054	[2-8] [8-64]	103,105
<i>M. gallisepticum</i>	Non déterminé	<i>In vivo/In vitro</i>	/	[5-16]	102
<i>Ureaplasma spp</i>	<i>tet(M)</i>	<i>In vivo/In vitro</i>	/	[2-32]	104
<i>M. bovis</i>	Mutations dans l'ARNr 16S	<i>In vivo</i>	966, 967, 1058	[2-16]	107

3.2 Les macrolides

3.2.1 Définition

Les macrolides sont des molécules hydrophobes constituées d'un noyau lactonique central de 12 à 16 chaînons. Ces antibiotiques peuvent être naturels ou semi-synthétiques. La première molécule isolée en 1952 est l'érythromycine. Depuis, une dizaine de molécules différentes ont été introduites sur le marché avec une meilleure activité antibactérienne, de meilleures caractéristiques pharmacologiques et une meilleure sécurité d'emploi comme la roxythromycine, la clarithromycine et l'azithromycine. La tylosine (mise sur le marché en 1983) et son dérivé, la tilmicosine (en 1996) sont des macrolides à 16 chaînons. Ils ont un usage strictement vétérinaire et sont souvent utilisés pour traiter les pneumonies des bovins et les infections à mycoplasmes. La tulathromycine et la gamithromycine, nouvelle génération de macrolides, sont de plus en plus utilisées, lors de traitement des mycoplasmoses (111).

3.2.2 Mode d'action

Les macrolides sont des molécules bactériostatiques. Elles agissent en inhibant la synthèse protéique par fixation au niveau de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome (111). Plus précisément, les macrolides se fixent sur le site localisé au niveau du cheminement du peptide en formation : ce site est le domaine V de l'ARN 23S, à proximité de la base de la cavité qui contient le centre peptidyl transférase (Figure 10). Cette fixation bloque la sortie du polypeptide avec libération prématurée du peptidyl-ARNt et inhibe la translocation du ribosome. La base nucléique clé de cette interaction macrolide/ribosome est l'adénine, située à la position 2058 du domaine V du 23S (112). D'autres emplacements dans le ribosome, comme le domaine II, peuvent jouer un rôle dans l'interaction ribosome/macrolide. De plus, deux protéines ribosomales, L4 et L22, codées respectivement par les gènes *rplD* et *rplV*, sont également impliquées dans cette interaction puisqu'elles jouent un rôle dans le maintien de la structure du ribosome durant le processus de la production protéique (29).

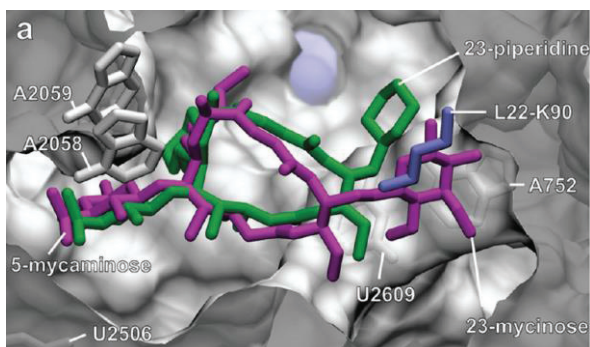


Figure 10 : Interaction entre la tylosine (en violet) et les différents domaines de l'ARNr 23S du ribosome (en vert) et la protéine L22 (en bleu) (112).

3.2.3 Etat des lieux de la résistance chez les mycoplasmes

A part *M. hominis* qui est intrinsèquement résistant aux macrolides à 14 et 15 chainons, les autres mycoplasmes, comme *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* et *M. bovis* sont naturellement sensibles aux macrolides. Néanmoins, les résultats récents de la détermination de la sensibilité des mycoplasmes aux macrolides montrent une augmentation des valeurs des CMI₅₀ dans beaucoup de pays européens et ailleurs dans le monde (102). Par exemple, et depuis les années 2000, les isolats de *M. pneumoniae* sont devenus moins sensibles aux macrolides au Japon, en Chine et aux États-Unis (63, 113-115). En France aussi, la prévalence des isolats cliniques de *M. pneumoniae* résistants aux macrolides a augmenté de moins de 1% à 10% en une courte période (de 1994 à 2007) (116, 117). De même, une étude récente menée en France sur des isolats de *M. agalactiae* collectés entre 2007 et 2009 a montré que les valeurs de CMI de la tylosine et la tilmicosine sont supérieures de 8 à 16 fois aux valeurs de CMI des souches isolées entre 1980 et 1990 (2).

Les mutations du site de liaison des macrolides avec le ribosome dans les domaines II et/ou V des sous-unités 23S des ARN ribosomiaux ainsi que dans les gènes *rplD* et *rplV* sont les mécanismes principaux conférant la résistance aux macrolides chez les mycoplasmes (tableau 6) (118).

Chez *M. hominis*, qui est naturellement résistant à l'érythromycine avec une CMI égale à 512 µg/mL, des mutations ponctuelles G₂₀₅₇A et C₂₆₁₀U dans l'ARNr 23S ont été observés. Par contre, d'autres mutations acquises *in vitro* comme A₂₀₅₉G ou C₂₆₁₁U dans une seule copie de l'ARNr 23S multiplient les valeurs de CMI de la tylosine par 16. La CMI passe alors de 32 µg/mL chez la souche sauvage à 512 µg/mL chez le mutant (118).

L'efflux actif, un autre mécanisme de résistance aux macrolides, n'a été suggéré chez les mycoplasmes que récemment. Des études d'accumulation en présence d'orthovanadate (un inhibiteur de l'hydrolyse de l'ATP) ont montré un doublement du taux d'accumulation intracellulaire de l'érythromycine chez *M. hominis*, ce qui suggère la présence éventuelle d'un transporteur endogène type ABC-transporteur à la base de ce phénotype (118).

Tableau 6 : Résistance acquise aux macrolides chez les mycoplasmes.

Les valeurs entre les deux crochets correspondent à une gamme de CMI

Espèces	Mécanismes	Positions	Etude	CMI µg/mL	Référence
<i>M. pneumoniae</i>	Mutations dans l'ARNr 23S (1 copie) L4/L22	A ₂₀₅₈ G C ₁₆₂ A A ₄₃₀ G C ₆₂ T, T ₂₇₉ C, C ₃₄₁ T, T ₅₀₈ C	<i>In vivo/In vitro</i> <i>In vitro</i>	[64-256]	115
<i>M. hominis</i>	Mutations dans l'ARNr 23S (2 copies)	A ₂₀₅₈ G C ₂₆₁₁ U	<i>In vivo/In vitro</i>	[16-64]	118
<i>M. gallisepticum</i>	Mutations dans l'ARNr 23S (1 copie) Mutations dans l'ARNr 23S (1 copie)	A ₂₀₅₈ G A ₂₀₅₉ G A ₂₀₅₈ G	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	[0,5-10] [256-512]	102
<i>Ureaplasma spp</i>	Mutations dans l'ARNr 23S (2 copies) Délétions/Insertions dans L4 « Efflux » « Méthylation »	G ₂₀₅₆ A A ₂₀₅₇ G A ₂₀₅₈ G	<i>In vivo/In vitro</i>	[64-128]	102
<i>M. bovis</i>	Mutations dans l'ARNr 23S (2 copies) Mutations dans L4 et L22 Mutations dans l'ARNr 23S (1 copie)	A ₂₀₅₈ G A ₂₀₅₉ G G ₇₄₈ A/C ₇₅₂ T G ₁₈₅ /T ₁₈₆ Q ₉₀ A ₂₀₅₈ G	<i>In vivo</i> <i>In vivo</i>	[32- >256] [32- ≥256]	119 120

En France, les souches récentes de *M. bovis* isolées entre 2009 et 2012 sont résistantes aux macrolides avec une CMI supérieur à 64 µg/mL, alors que celles isolées entre 1978 et 1979 sont sensibles (CMI < 1 µg/mL) (1).

Chez *M. bovis*, une étude assez récente a montré que l'accumulation des mutations dans les deux domaines II et V de la sous unité 23S du ribosome est en corrélation avec la

perte de sensibilité des souches de *M. bovis* (119). De plus, des substitutions multiples d'acides aminés ont été identifiées dans la protéine L4, aux positions 185-186 qui sont adjacentes au site de liaison du macrolide (119). En Chine, les souches de *M. bovis* s'avèrent aussi résistantes aux macrolides (CMI >64 µg/mL pour tylosine et tilmicosine) mais ne présentent qu'une seule mutation dans une seule copie de l'ARN 23S et plus précisément dans le domaine V, à la position 2058. Ces résultats suggèrent l'implication d'autres mécanismes moléculaires pour expliquer la résistance phénotypique observée (120).

La participation d'un système d'efflux a été évoquée chez *M. bovis* mais non démontrée expérimentalement (120). En effet, la détermination des CMI a été réalisée en présence et en absence d'un inhibiteur de pompe, le cyanide m-chlorophenyl hydrazone (120). La différence entre les valeurs des CMI n'était pas significative. Cette expérience a été réalisée une seule fois et avec un seul inhibiteur de pompe. Par conséquent, ces résultats restent à confirmer.

3.3 Les fluoroquinolones

3.3.1 Définition

Dérivées de l'acide nalidixique découvert en 1962, les quinolones forment une famille d'antibiotiques synthétiques utilisés aussi bien chez l'homme que l'animal. Dans les années 70, et afin d'améliorer la pénétration et la persistance de ces molécules dans les cellules, un atome de fluor a été rajouté sur les quinolones, ce qui a donné naissance aux fluoroquinolones. Trois générations de fluoroquinolones ont vu le jour jusqu'à présent. Ces différentes molécules se différencient par leur capacité de pénétration tissulaire et leur spectre d'action. Les quinolones de troisième génération telles que l'enrofloxacin, la marbofloxacin et la danofloxacin, sont les molécules les plus utilisées actuellement en médecine vétérinaire.

3.3.2 Mode d'action

Les fluoroquinolones empêchent la réplication de l'ADN bactérien en bloquant l'activité de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV. La fixation des fluoroquinolones sur la gyrase, pendant la phase de duplication de l'ADN, inhibe ce processus. L'interaction des quinolones avec la topoisomérase IV, protéine impliquée dans le surenroulement de l'ADN, induit des cassures dans l'ADN. Les quinolones se fixent aussi sur les extrémités des brins d'ADN qui alors ne peuvent plus se réassembler. La formation de ce complexe ADN-

quinolones est irréversible et conduit à la mort cellulaire. De ce fait, les fluoroquinolones sont des antibiotiques bactéricides (80).

3.3.3 Etat des lieux de la résistance chez les mycoplasmes

La résistance aux fluoroquinolones a été déjà décrite chez plusieurs espèces de mycoplasmes qu'elles soient d'origine humaine (*M. hominis* et *M. pneumoniae*) ou aviaire (*M. gallisepticum*) (121-123).

Chez *M. pneumoniae*, la résistance aux fluoroquinolones n'a été décrite qu'*in vitro* chez des mutants sélectionnés sous pression de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotique (123). Les mutants ont alors acquis une ou plusieurs mutations dans les protéines GyrA, GyrB, ParC ou ParE avec des CMI qui varient entre 8 et 32 µg/mL pour les différents fluoroquinolones testées (tableau 7). Chez *M. hominis*, une résistance à la ciprofloxacine a été décrite chez des isolats cliniques avec des CMI de 8 µg/mL.

Contrairement aux tétracyclines et aux macrolides, la sensibilité de *M. bovis* aux fluoroquinolones est toujours satisfaisante. Malgré la détection de quelques isolats cliniques résistants, les populations de *M. bovis* dans le monde restent sensibles avec des valeurs de CMI₅₀ qui ne dépassent pas 1 µg/mL (60, 62). Le même cas de figure a été récemment reporté chez *M. agalactiae* (2). Néanmoins, en Angleterre, la valeur de CMI₉₀ (c'est-à-dire la valeur de CMI de 90% de la population) de l'enrofloxacin est passée de 0,25 µg/mL en 2004 à plus de 32µg/mL en 2009 (61). Au Japon, les isolats de *M. bovis* ont des CMI élevées variant de 2,5 à 16 µg/mL (63, 124). En France, d'après Gautier-Bouchardon et al., la CMI₅₀ des souches françaises isolées entre 1978 et 1979 est de 0,25 µg/mL alors que celle des souches isolées entre 2009 et 2012 est de 0,5 µg/mL (1).

Plusieurs mécanismes de résistance ont été identifiés chez *M. hominis* comme la modification de la cible due à des mutations ponctuelles des gènes codant les protéines cibles (123, 125). La modification de la cible dans le cas des fluoroquinolones est un ensemble de substitutions de nucléotides dans des régions appelées QRDR (quinolone resistance determining regions) des gènes codant les gyrases et les topoisomérases : *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. Des mutations dans GyrA et ParC ont été décrites chez *M. hominis* (tableau 7). D'autres substitutions ont été également retrouvées dans GyrB et ParE chez *M. gallisepticum* mais sans lien ou corrélation directe avec les valeurs de CMI (126).

D'autres mécanismes de résistance existent aussi comme des mécanismes d'efflux qui résultent d'une surexpression des deux gènes codant pour une pompe ATP dépendante dans le cas des souches de *M. hominis* résistantes également au bromure d'ethidium (127, 128). Ce mécanisme n'a été caractérisé que chez cette espèce de mycoplasme pour les fluoroquinolones.

Tableau 7 : Résistance acquise aux fluoroquinolones chez les mycoplasmes.

Les valeurs entre les deux crochets correspondent à une gamme de CMI

Espèces	Mécanismes	Isolement	Positions	CMI µg/mL	Référence
<i>M. pneumoniae</i>	Mutations dans les QRDR	<i>In vitro</i>	99/GyrA 81-83-87/ParC 443-484/GyrB 449/ ParE	[2-128]	123
<i>M. hominis</i>	Mutations dans les QRDR	<i>In vivo/In vitro</i>	153-163/GyrA 84-91/ParC 450-453/GyrB 426-447-466/ParE	[2-32]	123,125
	Efflux actif				127,128
<i>M. gallisepticum</i>	Mutations dans les QRDR	<i>In vitro</i>	83-87/GyrA 80/ParC	[1-32]	126
	Mutations dans les QRDR	<i>In vivo</i>	83/GyrA 80/ParC	[1-10]	
<i>Ureaplasma spp</i>	Mutations dans les QRDR	<i>In vivo/In vitro</i>	83/GyrA 80/ParC	[4-32]	125
<i>M. bovis</i>	Mutations dans les QRDR	<i>In vivo</i>	83/GyrA 80-81/ParC	[2,5-16]	62, 124, 129
	Mutations dans les QRDR	<i>In vitro</i>	81-83/GyrA 78-80-81-84/ParC	[2-16]	

Récemment, une résistance aux fluoroquinolones a été identifiée chez des souches de *M. bovis* isolées au Japon (63). Cette résistance est codée par des mutations ponctuelles dans les régions QRDR et plus précisément des gènes *gyrA* et *parC* (124). Les mutations, généralement liées à la résistance et donc appelées « hotspots », sont généralement Ser83Phe/Leu dans GyrA, Ser80Ile, Ser81Tyr et Asn84Asp dans ParC (62, 124, 129).

4 Contexte et objectifs du travail

4.1 Contexte : Etat des lieux de la résistance en France chez *M. bovis*

Bien que la résistance aux antibiotiques chez *M. bovis* ait été largement étudiée dans plusieurs pays européens et dans le monde, la quantité des données disponibles peut sembler encore insuffisante comparée à l'importance des maladies causées par *M. bovis*.

Jusque récemment, aucune donnée concernant l'antibiosensibilité des souches françaises n'existait. Une étude, réalisée au sein du laboratoire et publiée en 2013 (1), a pour la première fois décrit les profils d'antibiorésistance des isolats français récents. Cette étude s'est intéressée à deux populations de souches : une population ancienne (1978-1979) et une population récente (2009-2012), les deux, essentiellement collectées grâce au réseau VIGIMYC. Cinq grandes familles d'antibiotiques ont été étudiées et les CMI de chaque antibiotique ont été déterminées pour l'ensemble des souches. Les familles d'antibiotiques testées étaient les phénicolés, les aminosides, les macrolides, les tétracyclines et les fluoroquinolones. Les résultats de cette étude ont montré une perte de sensibilité à la plupart des antibiotiques entre les souches anciennes et récentes à l'exception de quelques molécules comme les phénicolés. En effet, la CMI₅₀ du florfénicol était la même pour les deux populations (CMI=8 µg/mL) (1).

En revanche, pour la tylosine (macrolide) la CMI₅₀ des souches anciennes est de 2 µg/mL alors que toutes les souches récentes ont une CMI supérieure à 64 µg/mL (Figure 11-B). Ce même cas de figure a également été décrit pour la tilmicosine. D'autres molécules de macrolides ont aussi été testées comme la tulathromycine, la gamithromycine et la tildipirosine. Pour ces trois molécules, la distribution des CMI des différentes souches montre une perte de sensibilité moins importante par rapport à la tylosine et la tilmicosine.

La distribution des valeurs de CMI pour l'oxytétracycline montre un chevauchement entre les deux populations. En effet, quelques souches anciennes étaient déjà résistantes avec des valeurs de CMI élevées allant de 16 à 32 µg/mL. Par contre, les souches récentes sont toutes très résistantes avec des CMI supérieures à 32 µg/mL.

Pour les fluoroquinolones, la perte de sensibilité des souches est très modérée. Les CMI₅₀ des trois molécules testées sont de 0,25 et 0,5 µg/mL pour les souches anciennes et les récentes respectivement (Figure 11-A).

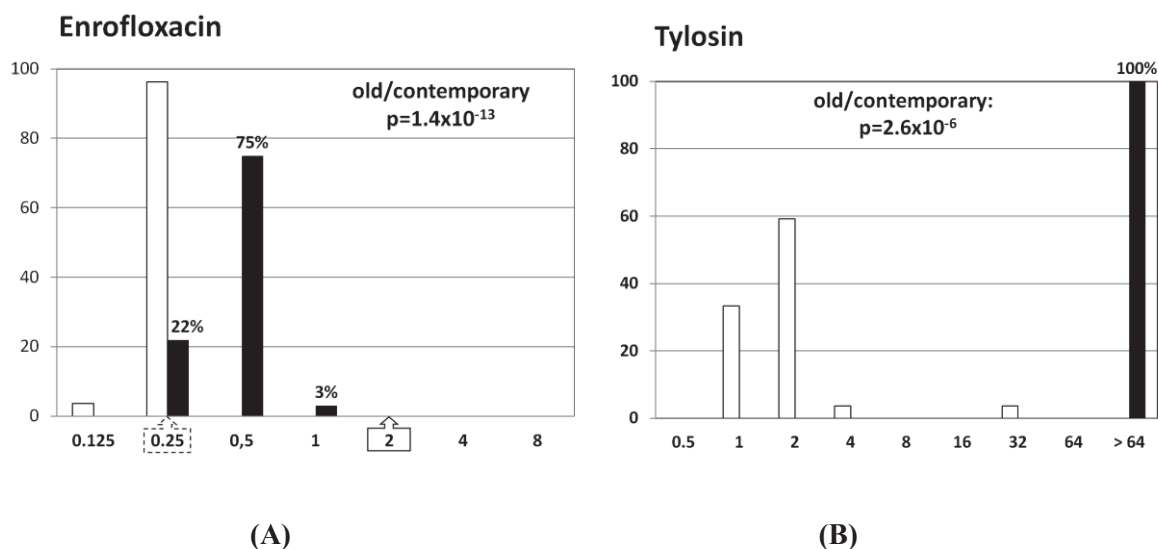


Figure 11 : Distribution d'une population d'isolats de *M. bovis* collectés en France en fonction de la valeur de CMI mesurée pour l'enrofloxacin (A) et la tylosine (B) (1).

Les valeurs encadrées sont les seuils épidémiologiques pour les *Pasteurellaceae*.

Axe des abscisses : CMI en µg/mL, Axe des ordonnées : % des souches,

Barres blanches : isolats 1978-1978 , Barres noires : isolats 2009-2012

En parallèle, une autre étude réalisée au sein de l'UMR sur un groupe d'isolats prélevés entre 1978 et 2012, a montré que la population française d'isolats de *M. bovis* se divise en deux sous-types moléculaires, le premier comprenant les isolats collectés avant 2000, ST1, et le deuxième comprenant les isolats collectés après 2000, ST2 (95). Dans cette étude, trois méthodes de sous-typage avaient été utilisées : MLST, MLVA et MALDI-TOF, et qui avaient donné des résultats concordants. Par ailleurs, les souches récentes sont apparues plus homogènes par rapport aux anciennes, avec moins de variabilité génétique dans les gènes étudiés. Ces résultats suggèrent la propagation d'un clone unique multi-résistant dans tout le pays puisque les souches récentes de *M. bovis* sont résistantes à la majorité des familles d'antibiotiques utilisées en France (1). Une seule souche a fait l'exception de l'ensemble des résultats, la souche #15527 qui a été classée dans un troisième sous-type moléculaire, le sous-type 3 (ST3), ayant plus de variabilité génétique que les sous-types moléculaires ST1 et ST2 (16 positions de polymorphisme avec le ST1 pour le gène *polC* par exemple, alors que les isolats du ST2 ont seulement une position de polymorphisme avec le ST1 (95)).

Ces deux études ont montré que la population récente d'isolats de *M. bovis* circulant en France est génétiquement homogène avec un phénotype multi-résistant aux antibiotiques.

4.2 Objectifs de l'étude

Les mécanismes de résistance des isolats de *M. bovis* aux différents antibiotiques ont été caractérisés dans plusieurs études (62, 107, 119, 120, 124, 129). Le mécanisme le plus souvent décrit est la modification de la cible par mutation de celle-ci. Les mutations des sites de liaison des macrolides avec le ribosome dans les domaines II et/ou V des ARN ribosomiaux 23S ainsi que dans les gènes *rplD* et *rplV*, sont les mécanismes principaux conférant la résistance aux macrolides chez les isolats de *M. bovis* dans le monde (62, 102, 119). En ce qui concerne les tétracyclines, les mutations de la cible sont aussi le mécanisme conférant la résistance aux isolats résistants de *M. bovis* (62, 107). Ces mutations se situent dans les ARNr 16S de *M. bovis*, cible de ces antibiotiques. Pareillement, une résistance aux fluoroquinolones par modification de la cible au niveau des QRDR a été décrite pour des souches de *M. bovis* isolées dans d'autres pays (124, 129).

Les mécanismes moléculaires de résistance n'ont jamais été étudiés jusqu'à présent chez les isolats de *M. bovis* en France. Le premier objectif de cette étude sera de déterminer les mécanismes à la base de perte de sensibilité chez les isolats français. Ces mécanismes seront donc recherchés pour trois familles d'antibiotiques choisies parmi les cinq étudiées dans la précédente étude de Gautier-Bouchardon et al 2013. Dans un premier temps, les fluoroquinolones seront étudiées parce que la résistance de *M. bovis* à cette famille est encore modérée. Dans un deuxième temps, les macrolides et les tétracyclines, seront étudiées afin de comprendre comment et quand le phénomène de résistance observé pour ces deux familles a émergé.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé un des atouts majeurs du laboratoire de l'Anses Lyon qui est la disponibilité d'un grand nombre d'isolats de *M. bovis* collectés grâce au réseau VIGIMYC. Les commémoratifs (origine, pathologie et année de l'isolement de chaque isolat) disponibles avec la collection permettent également d'avoir des données épidémiologiques en lien avec les souches étudiées. L'existence au laboratoire d'un savoir-faire pour l'identification et le sous-typage de *M. bovis* ainsi que pour la détermination de niveau de résistance était un avantage supplémentaire pour le bon déroulement de ce travail.

4.2.1 CHAPITRE 1 : les fluoroquinolones

La situation décrite pour cette famille d'antibiotique reste favorable puisque les valeurs de CMI des souches récentes restent assez faibles avec une CMI₅₀ égale à 0,5 µg/mL. Il nous a donc semblé naturel et intéressant de commencer par étudier les mécanismes à la base de la perte de sensibilité des souches *M. bovis* aux fluoroquinolones (Figure 10). La

recherche des mécanismes sous-tendant ce phénotype repose sur les données de la littérature. L'investigation des modifications de la cible, ici les régions QRDR, avait été la piste privilégiée. Le travail a été réalisé sur deux populations d'isolats, des anciens (1978-1979) d'une part et des récents (2009-2014) d'autre part. Ce choix nous permet d'inclure une population témoins (1978-1979) et une population récente élargie pour rechercher des souches de sensibilité diminuée (Figure 11-A).

Pour cela, un ensemble de 52 isolats groupés dans deux sous-populations, 11 isolats anciens (1978-1979) et 41 isolats récents (2009-2014) a été constitué. Pour cet ensemble, les CMI pour trois molécules de fluoroquinolones vétérinaires; l'enrofloxacin, la danofloxacin et la marbofloxacin ont été déterminées. De plus, les régions QRDR ont été séquencées pour l'ensemble des souches et comparées à la séquence de la souche de référence PG45^T.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à établir un lien entre les phénotypes d'antibiosensibilité et les sous-types moléculaires afin de comprendre les comportements de ces différents génotypes vis-à-vis des fluoroquinolones *in vitro*. La sélection des mutants de chaque isolat par plusieurs passages en milieu solide puis liquide en présence des concentrations croissantes d'enrofloxacin a été réalisée. Ensuite, les CMI pour les trois fluoroquinolones et les séquences des QRDR ont été déterminées.

4.2.2 CHAPITRE 2 : les macrolides et les tétracyclines

Les macrolides et les tétracyclines sont deux familles d'antibiotiques bactériostatiques qui ciblent les ARNs ribosomiaux. En France, la résistance à ces deux familles chez les isolats récents de *M. bovis* est très élevée (CMI > 32 µg/mL). La différence des CMI entre les souches anciennes et les souches récentes est importante. On ignore cependant à quel moment entre 1979 et 2009 ont émergé les premières souches résistantes (Figure 11-B). Le premier objectif de cette deuxième étude a été de caractériser toutes les souches françaises isolées entre 1978 et 2014 afin de tracer l'historique de l'émergence et de comprendre le lien entre les différents sous-types moléculaires, les profils d'antibiosensibilité et les pratiques d'antibiothérapie.

Cette étude a eu comme premier but d'examiner l'évolution, au fil du temps, de l'apparition des isolats *M. bovis* avec des CMI élevées pour les macrolides (tylosine et tilmicosine) et les tétracyclines (oxytétracycline). Les valeurs des CMI pour ces trois molécules ont été déterminées pour 76 isolats.

Le deuxième objectif a été de comprendre les mécanismes moléculaires qui étaient à la base du changement de sensibilité et du passage d'une population fortement sensible dans les années 1978-1979 à une population fortement résistante en 2012, comme précédemment observé dans l'étude de Gautier-Bouchardon et al 2013. Les analyses ont donc été réalisées sur les régions cibles de ces molécules, les gènes de l'ARNr 16S, de l'ARNr 23S, et des protéines L4 et L22. Les 76 isolats testés, isolés entre 1978 et 2014, sont répartis en deux groupes : des isolats issus de pneumonies et des isolats issus ou provenant d'autres maladies (mammite, otite, arthrite...) afin de comprendre si les différences de pratiques thérapeutiques peuvent influencer les profils de sensibilité.

Enfin, un troisième critère, le sous-type moléculaire, a aussi été défini pour l'ensemble des isolats afin d'établir un lien entre les valeurs de CMI, l'année d'isolement, la maladie associée et le sous-type moléculaire.

CHAPITRE 1

**CHAPITRE 1: Alterations in the Quinolone Resistance
Determining Regions and fluoroquinolone resistance in
clinical isolates and laboratory-derived mutants of
Mycoplasma bovis: not all genotypes are equal**

Dima Khalil^{1,2}, Claire Becker^{2,1}, Florence Tardy^{1,2}

¹Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France

²Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy L'Etoile,
France

Article publié dans AEM (Applied and Environmental Microbiology) le 04
décembre 2015



Alterations in the Quinolone Resistance-Determining Regions and Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates and Laboratory-Derived Mutants of *Mycoplasma bovis*: Not All Genotypes May Be Equal

Dima Khalil, Claire A. M. Becker, Florence Tardy

ANSES, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France, and Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy l'Etoile, France

Mycoplasma bovis is considered a major contributor to respiratory diseases in young cattle. Resistant *M. bovis* isolates have increasingly been reported worldwide due to extensive use of antimicrobials to treat bovine pneumonia. The frequency of isolates resistant to fluoroquinolones varies considerably from one country to another. The MICs of isolates collected in France have only increased from “very low” to “low.” The present study was conducted to investigate whether alterations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) could account for this slight modification in susceptibility. No correlation between QRDR alterations and increased MICs was evidenced in clinical isolates. In addition, all clinical isolates were subtyped, and the tendencies of the different sequence types to develop resistance through mutations in QRDRs under selective pressure *in vitro* were examined. *In vitro*, 3 hot spots for mutations in QRDRs (position 83 in GyrA and positions 80 and 84 in ParC) were associated with a high level of resistance when cumulated. We showed that the point mutations in the QRDRs observed *in vitro* were different (in location and selection rapidity) between the different subtypes. Our *in vitro* observations were corroborated by the recent detection of a clinical isolate highly resistant to fluoroquinolones (MIC $\geq 16 \mu\text{g/ml}$) and belonging to the subtype which easily accumulates QRDR alterations *in vitro*. The current increased prevalence of this subtype in clinical isolates highlights the urgent need to control fluoroquinolone usage in veterinary medicine.

Mycoplasma bovis is a wall-less bacterium responsible for severe infections in cattle, including pneumonia, mastitis, arthritis, and otitis (1). In young cattle, it is now recognized as a major contributor to economic losses associated with bovine respiratory diseases (BRD). The infection pressure of BRD usually peaks 2 to 3 weeks after calves are mingled in fattening units following transportation from their respective birth farms (2). Since no efficient vaccines are available and licensed for use outside the United States (3), efforts to control *M. bovis* infections often rely on antimicrobial treatments, administered either prophylactically or in the early stages of the disease. Antimicrobials used for the treatment or prevention of BRD usually include broad-spectrum cephalosporins (cefquinome and ceftiofur), extended-spectrum fluoroquinolones (enrofloxacin, danofloxacin, and marbofloxacin), florfenicol, and long-lasting macrolides (tulathromycin, gamithromycin, and tildipirosin) (4). This extensive use of antibiotics has predictably resulted in an increase in resistant isolates over time. In France, it was recently shown that contemporary *M. bovis* strains had become significantly less susceptible than archival strains to 9 of the 12 antimicrobials tested (5). With regard to fluoroquinolones, the decrease in susceptibility was limited (only 1 dilution of the MIC), and no highly resistant isolates were observed in a set of more than 90 strains. This was unexpected, since one of the two major medical indications of injectable extended-spectrum fluoroquinolones for cattle is BRD (6). However, in contrast to other antimicrobials, such as tulathromycin, tilmicin, ceftiofur, and florfenicol, expanded-spectrum fluoroquinolones are not approved for metaphylaxis or prevention in herds (2, 7). This restricted use could have limited the acquisition of resistance in France. Moreover, we recently demonstrated that recent

M. bovis isolates from France belong to the same unique subtype and suggested that this monoclonal spread on a country-wide scale could be linked to the acquisition and selection of multiresistance through therapeutic practices and prevention strategies (8). The reason for fluoroquinolones being spared in this selection process has yet to be clarified.

Elsewhere in the world, results for *M. bovis* susceptibility to fluoroquinolones are very varied. Three studies reported highly resistant isolates, with MICs of $>8 \mu\text{g/ml}$, in the United Kingdom, Japan, and Belgium (9–11), while several others indicated a low to no increase in resistance, except for a few isolates, in Japan, the United States, and several European countries (6, 12–15). Some of these studies involved isolates collected before 2005 (11, 13), but the majority referred to recent ones (6, 9, 10, 12, 14, 15), suggesting a recent phenomenon. In the United Kingdom, a shift of resistance from an MIC₉₀ of 1 $\mu\text{g/ml}$ to one of 32 $\mu\text{g/ml}$ occurred during the last decade (9, 16). This significant increase over a

Received 7 October 2015 Accepted 22 November 2015

Accepted manuscript posted online 4 December 2015

Citation Khalil D, Becker CAM, Tardy F. 2016. Alterations in the quinolone resistance-determining regions and fluoroquinolone resistance in clinical isolates and laboratory-derived mutants of *Mycoplasma bovis*: not all genotypes may be equal. Appl Environ Microbiol 82:1060–1068. doi:10.1128/AEM.03280-15.

Editor: E. G. Dudley, Pennsylvania State University

Address correspondence to Florence Tardy, florence.tardy@anses.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03280-15>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

relatively short period is indicative of highly efficient resistance mechanisms. Quinolones are synthetic bactericidal agents that are able to eliminate actively dividing bacteria by inhibiting the topoisomerases II and IV required for DNA replication. In mycoplasmas, resistance to fluoroquinolones generally results from several alterations in the so-called quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of the genes encoding topoisomerases, namely, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* (17). No alterations related to resistance to fluoroquinolones have been found so far in *gyrB* or *parE* in any clinical isolates of mycoplasmas (17). In contrast, two hot spots for mutations, in *ParC* and *GyrA*, were described for *M. bovis* isolates and were associated with large increases of the MICs (2.5 to 16 µg/ml). These were the Asp84Asn substitution in *ParC* associated or not with the Ser83Phe mutation in *GyrA* (10, 12). Although target mutations are the main mechanisms conferring resistance to fluoroquinolones, an active efflux system has been described for the human pathogen *M. hominis* and suggested for another ruminant mycoplasma, *M. mycoides* subsp. *capri*, but has so far not been reported for *M. bovis* (18–20).

The present study was conducted to examine the presence of potential alterations in the QRDRs of *M. bovis* clinical isolates collected in France and whether these could account for the previously observed decrease in susceptibility to fluoroquinolones. In addition, clinical isolates were subtyped by single-locus sequence typing (8) and multilocus sequence typing (MLST) (21), and their ability to become resistant to fluoroquinolones through mutations of their QRDRs was explored *in vitro*. The results were analyzed in order to determine whether the process and rapidity of developing resistance to fluoroquinolones under selective pressure may differ by subtype.

MATERIALS AND METHODS

Mycoplasma isolates, growth, identification, and subtyping. Fifty-two French *M. bovis* clinical isolates were included in this study (see Table S1 in the supplemental material). They originated from a collection maintained at ANSES Lyon and mostly derived from the French national surveillance network for mycoplasmoses of ruminants (VIGIMYC) (22). They were identified by membrane filtration dot-immunobinding tests (23) and by a species-specific PCR assay targeting the *polC* gene (24). Strain PG45^T and two isolates from neighboring Switzerland (25) were added as controls. Isolates were grown in PPLO broth, modified as previously described (26), at 37°C in 5% CO₂. Each isolate was subtyped by single-locus sequence typing (using a 486-bp region of the *polC* gene), which has been shown to provide relevant typing results (8). Clustering of the isolates was confirmed by applying the MLST scheme of Register et al. (21). In brief, the *adh-1*, *gltX*, *gpsA*, *gyrB*, *pta-2*, *tdk*, and *tkl* loci were amplified by PCR and sequenced. A polyfasta file comprising the 7 alleles was generated for each isolate and uploaded into a newly created MLST database (<http://pubmlst.org/mbovis/>) to be assigned a subtype. Individual subtypes were compared to those already present in the database.

MIC assays. The MICs of enrofloxacin (ENR), danofloxacin (DAN), and marbofloxacin (MAR), all purchased from Sigma, were determined using the agar dilution method on modified PPLO agar as previously described (5, 27). In brief, 1-µl aliquots of each strain, diluted to 10⁴ to 10⁵ CFU/ml, were spotted onto agar plates containing serial 2-fold dilutions of each fluoroquinolone (0.125 to 64 µg/ml). MIC assays were performed at least twice for each isolate. The MIC was defined as the lowest fluoroquinolone concentration causing 100% inhibition of growth at 37°C in 5% CO₂ for 72 h. The number of CFU per milliliter was determined by plating 2-µl aliquots of serial 10-fold broth dilutions onto agar plates. After incubation for 3 days, the colonies for several dilutions were counted

using a stereomicroscope, and the mean final cell concentration was determined.

Selection of spontaneously ENR-resistant *M. bovis* variants. ENR-resistant clones were selected by plating 50-µl aliquots of parental cultures at 10⁷ to 10⁸ CFU/ml onto agar medium containing increasing inhibitory concentrations of enrofloxacin as described elsewhere (10, 28), with minor modifications. Each selection experiment involved four steps, using ENR concentrations of 1, 2, 4, and 8 times the MIC for the respective parent isolate (see Fig. 1 for details). At each selection step, resistant colonies were picked from the agar plates after incubation for 7 days and recultured in broth medium containing an equivalent amount of enrofloxacin before being inoculated onto another plate with twice that antimicrobial concentration. The recovery frequency was determined as the number of colonies appearing on the plate in the presence of enrofloxacin divided by the number of colonies contained in the inoculum. Several individual colonies were picked from the agar plate at each step in order to (i) analyze their QRDRs and (ii) determine their MICs.

PCR amplification and sequence analysis of *gyrA*, *gyrB*, *parE*, and *parC* QRDRs. Genomic DNAs were extracted from 20-ml logarithmic-phase broth cultures of *M. bovis* by using the phenol-chloroform method (29). QRDRs were amplified using previously described specific primers (12). For *parE*, the hybridization temperature in the original publication was modified from 56°C to 54°C. PCR products were sequenced using an external facility at Beckman Coulter Genomics. Sequence editing, consensus, and alignment construction were performed using Seaview software (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>). For convenience, the amino acid numbering refers to the *Escherichia coli* numbering and is based on the *E. coli* K-12 sequences for *GyrA* (AAC75291.1), *GyrB* (AAT48201.1), *ParC* (AAC76055.1), and *ParE* (AAA69198.1).

RESULTS

An initial set of 31 clinical isolates of *M. bovis*, either old (1978 to 1983) or recent (2009 to 2012), was randomly chosen from our collection. These isolates were then subtyped by sequencing of the *polC* locus as previously described (8). As expected, all old strains and PG45^T were homogeneously grouped into subtype 1 (ST1), while most (19/20 strains) of the recent strains were subtype 2 (ST2), which diverges from ST1 by one single nucleotide polymorphism (SNP) in the 486-bp *polC* locus. One of the recent isolates (strain 15527) belonged to ST3, an uncommon subtype characterized by 16 SNPs (see Table S1 in the supplemental material) (8).

The susceptibilities of the isolates to 3 fluoroquinolones, namely, enrofloxacin (ENR), danofloxacin (DAN), and marbofloxacin (MAR), were determined according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), using the agar dilution method for MIC estimation (27). *M. bovis* PG45^T was used as a control. Moderate increases in the MICs, i.e., 2-fold for ENR and 4-fold for DAN and MAR, were observed for all recent isolates in comparison to PG45^T and the old isolates (Table 1). In contrast, 2 recent isolates from Switzerland were shown to be susceptible. These results are consistent with those of a previous study (5) and suggest an ongoing shift of isolates from the *M. bovis* population in France toward a low-level, non-clinically relevant quinolone resistance phenotype.

In order to determine whether this shift was associated with mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs), we then sequenced the *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* QRDRs. Apart from a silent mutation in *ParC* (position 84; GAC → GAT; Asp), all recent isolates harbored a single amino acid substitution in *GyrB* (Asp362Asn) that was absent from all old strains and PG45^T. This mutation had already been described and

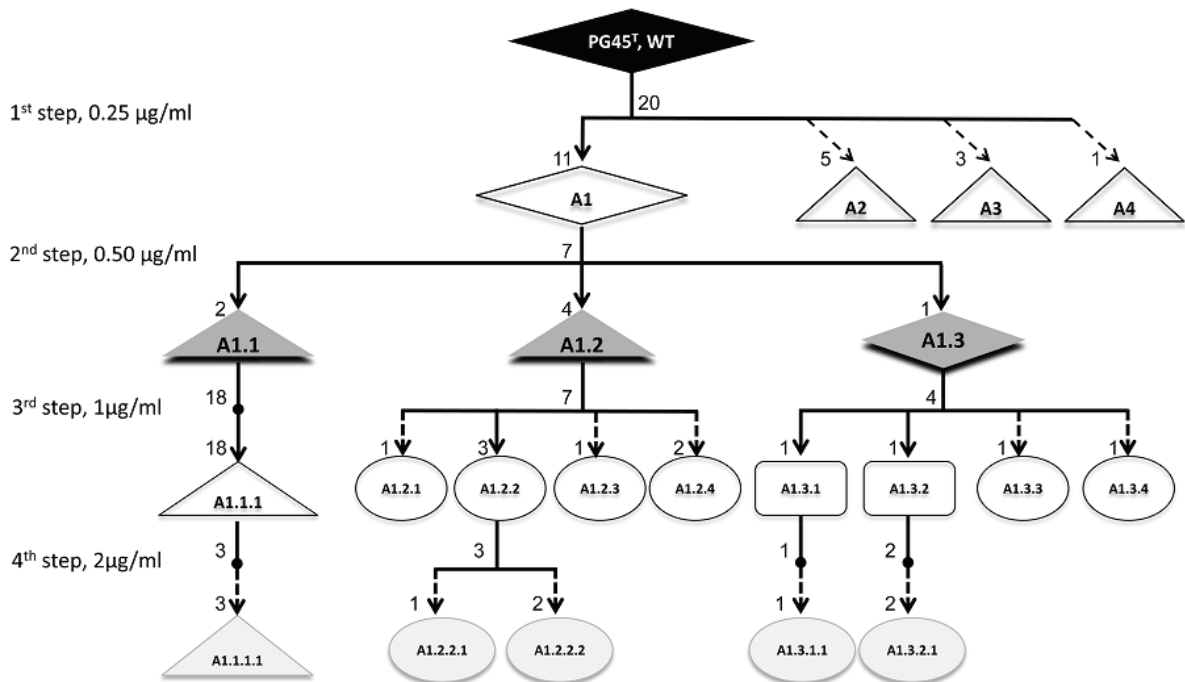


FIG 1 Experimental design of *in vitro* selection assays with enrofloxacin, using PG45^T as an example. The selected clones are named by a letter followed by incremental numbers corresponding to successive experimental steps. The diamond symbols represent clones with no mutation, while clones with alterations in ParC, GyrA, and both loci are shown as triangles, squares, and circles, respectively. The numbers at nodes and arrow extremities indicate the number of clones isolated for each step and their distribution within the different genotypes. The enrofloxacin concentration for each step is indicated on the left. MIC assays were performed for all PG45^T-derived clones except A2, A3, and A4. Dotted arrows indicate experimental steps with no further selection passages.

linked to the recent *M. bovis* subtype ST2 (8). However, this mutation was also present in recent susceptible isolates from Switzerland and has never been described for highly resistant strains, so it is unlikely to be associated with resistance. No mutations in GyrA and ParE were evidenced, and only three isolates showed single mutations in ParC, either in codon 80 (Ser → Ile) or in codon 84 (Asp → Tyr), but without any marked difference in their MICs.

Hence, the observed shift in fluoroquinolone susceptibility was not associated with mutations in QRDRs.

We also investigated whether clinical isolates were equally able to achieve higher, clinically relevant MICs through the acquisition of mutations in their QRDRs *in vitro*. The following three isolates, representing different genomic backgrounds (subtypes and QRDR genotypes), were chosen for the *in vitro* selection process: PG45^T

TABLE 1 Relationships between MIC values and mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* QRDRs of *M. bovis* clinical isolates

Isolate name or characteristic	Origin, no. of isolates, yr of isolation	MIC (value or range) (µg/ml) ^a			QRDR-encoded substitution ^b
		ENR	DAN	MAR	
PG45 ^T (control)	USA, 1, 1962	0.25	0.25	0.5	No. of isolates with phenotype/total no. of isolates
Old	France, 11, 1978–1983	0.125–0.25	0.125–0.25	0.25–1	11/11
Recent	France, 20, 2009–2012	0.25–0.5	0.5–1	0.5–2	17/20
		0.5	1	2	1/20
		0.5–1	0.5–1	2 ^c	2/20
Contemporary ^f	France, 21, 2013–2014	0.25–0.5	0.5–1	0.5–2	20/21
Control	Switzerland, 2, 2010–2011	16	16	>64	1/21
		0.125 ^c	0.25 ^c	0.5 ^c	2/2

^a ENR, enrofloxacin; DAN, danofloxacin; MAR, marbofloxacin.

^b The genotype of PG45^T was used as a reference, and *E. coli* amino acid numbering was used. There were no mutations in ParE.

^c Same MIC values for both strains.

^d Mutation already described for *M. bovis* isolates in other countries (10, 12).

^e Data in bold refer to the recently detected clinical isolate with high-level resistance to fluoroquinolones.

for subtype ST1, 15762 for ST2, and 15527 for ST3 (Table 2). In addition, two isolates belonging to ST2 and showing native alterations in ParC compared to 15762 were also selected (15488 and 15875). Laboratory-generated mutants were obtained by stepwise exposure to increasing concentrations of ENR, as illustrated in Fig. 1 for PG45^T.

The first selection step consisted of plating the wild-type (WT) isolate onto agar medium containing ENR at a concentration corresponding to its MIC. Table 2 shows the frequencies at which ENR-resistant clones were recovered and the distribution of randomly selected colonies between the different types of QRDR mutants. In general, the recovery frequency of ENR-resistant clones was low (6×10^{-7} to 2×10^{-5}) regardless of the parental subtype. Eight different amino acid substitutions were identified as being encoded in the QRDRs of mutants: five in GyrA, three in ParC, and none in GyrB. No ParE sequences were analyzed, since previous studies had shown that they were seldom altered and that the rare mutations obtained were not associated with fluoroquinolone resistance (10, 12, 17). Two mutations (Ser83Phe in GyrA and Asp84Asn/Gly in ParC) recurred in several mutants derived from different parental isolates. The lowest rate of mutation acquisition was observed for isolate 15762 (ST2), with no mutation at all during the 1st selection step, and also for PG45^T (ST1), for which 45% of the selected colonies were mutated (clones A2, A3, and A4 in Fig. 1). Another ST2 isolate, 9072, was also included in the first step of ENR selection but failed to grow under antibiotic pressure, despite repeated attempts. Since the 2nd step of *in vitro* selection was carried out before sequences were available, many of the generated ENR-resistant colonies were not put into broth culture and hence were not available for susceptibility tests. However, several of the selected ENR-resistant colonies showed 2- to 32-fold increases in the fluoroquinolone MICs (Table 2). Resistant colonies that had not acquired any mutations, such as strains PG45^T (clone A1 in Fig. 1) and 15762, showed at most a 2-fold increase in the MIC. In contrast, mutants with alterations in both GyrA and ParC, the latter either inherited from parental strains (isolates 15488 and 15875) or acquired during the selection process (isolate 15527 and clones of genotype 2 [GT2] and GT3), attained MICs as high as 64 µg/ml.

Four ENR-resistant clones with different genotypes (subtypes and QRDRs) were selected during the 1st step for further selection. These were clones of GT1 from PG45^T (ST1), GT4 from 15762 (ST2), and GT2 and GT3 from 15527 (ST3) (Table 2).

Additional point mutations were identified in GyrA and ParC during the successive selection steps (Table 3; Fig. 1). The substitutions varied, but their positions in the QRDRs were always the same. The most frequently altered codons were those for Ser83 in GyrA and Asp84 in ParC, and their concomitant mutation was systematically associated with high MICs (Table 3). Another mutation in ParC, namely, Ser80Ile, was associated with a high MIC for PG45 mutants (ST1). The Gly81Asp/Asn mutation in GyrA was observed after the 3rd and 4th selection steps, and only in PG45 mutants. Interestingly, the frequencies of recovery of ENR-resistant clones varied only slightly (10^{-6} to 10^{-4}) for PG45^T (ST1) and 15762 (ST2), regardless of the selection step, but varied a lot (10^{-7} to 1) for clones derived from 15527 (ST3). More specifically, when the selection pressure was lower than the MIC attained in the 1st selection step, no new mutation was acquired and, as expected, the recovery frequency reached about 1. Furthermore, once the two key mutations (GyrA Ser83Phe and ParC

Asp84Asn) had been acquired, the enrofloxacin concentrations could be increased rapidly without influencing the mutant's ability to grow. The switch from Asn to Lys at position 84 of ParC, which corresponds to a change of the amino acid R-group charge from neutral to positive, contributed to further increasing the MIC. In contrast, for isolates belonging to the ST2 subtype, it was either impossible (9072) (data not shown) or difficult (15762) to maintain viable mycoplasma cells under increasing selective pressure, and no mutation in ParC was acquired over the whole selection process.

Because the ability to develop resistance to fluoroquinolones through mutations in the QRDRs under selective pressure *in vitro* was different for the different subtypes, we investigated the evolution of clinical isolates by screening a more recent set of isolates. The susceptibilities to fluoroquinolones and the subtypes of 21 clinical isolates collected in 2013 and 2014 were determined (Table 1; see Table S1 in the supplemental material). The poorly abundant subtype ST3, which represented only 5% of the recent (2009 to 2012) *M. bovis* population, was found to have become more prevalent (20%) in the contemporary (2013 and 2014) *M. bovis* population. The MIC distributions were identical to those for the 2009-2012 isolates, except for one isolate, namely, 8428, that was shown to be highly resistant to all 3 fluoroquinolones (MICs of ≥ 16 µg/ml). These high MIC values were associated with the Ser83Phe mutation in GyrA and the Ser80Ile mutation in ParC, i.e., two of the mutations that had been observed in mutants selected *in vitro*. Furthermore, this isolate was demonstrated to be of the ST3 molecular subtype (see Table S1).

The clustering of isolates into different subtypes based on single-gene polymorphism (*polC*) was further confirmed using the MLST scheme proposed by Register et al. (21). The *polC*-defined ST1, ST2, and ST3 subtypes were grouped under ST17, ST18, and ST5, respectively, in the MLST tree of Register et al., with ST17 and ST18 belonging to the same clade, thereby confirming the distribution of isolates between different genotypes. Moreover, another isolate from the ST3 subtype, namely, 8619, was randomly chosen to confirm our *in vitro* selection results obtained with isolate 15527, originally chosen as representative of ST3. Twenty percent of the isolate 8619 colonies selected in the 1st step were shown to have gained a mutation in GyrA (Ser83Phe) (Table 2) associated with a moderate increase in MICs. In the 3rd selection step, as soon as some of the ParC codons had been altered (Ser80Ile or Asp84Gly/Asn/Tyr), the MICs reached very high values. This result confirms the ease with which ST3 isolates acquire and select key point mutations in QRDRs that lead to a high level of resistance to fluoroquinolones.

DISCUSSION

Most often, a low level of resistance to fluoroquinolones, associated with a narrow MIC distribution in the range of 0.25 to 4 µg/ml, is considered to represent a single homogeneous population of isolates (6). However, in the French *M. bovis* population, the MIC distribution of enrofloxacin, in the range of 0.125 to 1 µg/ml, was previously shown to be bimodal, with a very moderate shift of MICs between old and recent isolates (5). This shift was further associated with a modification of the molecular subtype from ST1 (old isolates) to the predominant subtype ST2 (recent isolates) (8). In the present work, we confirmed the existence of two groups of clinical isolates with different MIC levels. Old strains, isolated between 1978 and 1983, were highly susceptible

TABLE 2 Characterization of the 1st-step enrofloxacin-resistant clones selected *in vitro*

Isolate (ST)	ENR concn ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery frequency (no. of clones)	Mutation distribution (no. of clones with mutation/total no. of clones)	QRDR mutation at indicated position ^b										MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^c		
				GyrA			GyrB			ParC				ENR	DAN	MAR
				81	83	87	362	80	84	98	Genotype					
PG45 (ST1)	0.25	2E-05 (20)	11/20	Gly	Ser	Glu	Asp	Ser	Asp	Thr	WT	0.25	0.25	0.5		
	0.25		5/20						<u>Gly</u>		GT1	0.25	1	0.5		
	0.25		3/20						<u>Asn</u> <u>Asn</u>	<u>Arg</u>		NA	NA	NA		
15762 (ST2)	0.25	3E-06 (20)	20/20	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser	Asp	Thr	WT	0.25	0.5	1		
											GT4	0.25	0.5	1		
	0.25															
15488 (ST2)	2	6E-07 (5)	3/5	Gly	Ser	Glu	Asn	Ile	Asp	Thr	WT	0.5	1	2		
	2		1/5		<u>Phe</u> <u>Tyr</u>							16	16	>64		
	2		1/5			<u>Gly</u>						NA	NA	NA		
15875 (ST2)	2	4E-07 (4)	3/4	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser	Tyr	Thr	WT	1	1	2		
	2		1/4		<u>Phe</u>	Lys						4	8	8		
												4	8	8		
15527 (ST3)	0.5	7E-05 (12)	1/12	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser	Asp	Thr	WT	0.5	0.5	2		
	0.5		6/12									NA	NA	NA		
	0.5		1/12			<u>Val</u> <u>Val</u>						NA	NA	NA		
	0.5		2/12						<u>Gly</u>			NA	NA	NA		
	0.5		1/12		<u>Phe</u> <u>Phe</u> <u>Phe</u>				<u>Asn</u> <u>Asn</u>	<u>Arg</u>	GT12 GT3	4	4	8		
8619 (ST3)	0.25	2E-06 (10)	8/10	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser	Asp	Thr	WT	0.25	0.5	0.5		
	0.25		2/10		<u>Phe</u>							NA	NA	NA		
												1	2	1		

^a Resistant colonies were selected on plates containing enrofloxacin at the indicated concentrations. The recovery frequency was determined as the number of colonies appearing on the plate in the presence of enrofloxacin divided by the number of colonies contained in the inoculum.

^b Point mutations detected in QRDRs of *gyrA*, *parC*, and *gyrB* are presented as the corresponding amino acid substitutions in individual clones. For each isolate, the WT phenotype is shown first. The GT1, GT2, GT3, and GT4 genotypes were used to perform further selection steps. When the phenotype of an isolate differs from that of PG45^r, the mutation is indicated in bold. Newly acquired mutations are underlined.

^c MIC of an ENR-resistant mutant representing the genotype. NA, not applicable (mutant not available in broth culture).

TABLE 3 Characteristics of ENR-resistant clones obtained *in vitro* under increased selective pressure, point mutations in QRDRs, and MIC values

Clone ^a	ENR concn (µg/ml) ^b	Mutation distribution ^c			Mutation at indicated position						MIC (µg/ml) ^d			
		2nd step	3rd step	4th step	GyrA			ParC			ENR	DAN	MAR	
					Gly81	Ser83	Glu87	Ser80	Asp84	Thr98				
PG45 (GT1 [ST1], GyrB Asp362, 0.25)	0.5	2/7							Ile			4	8	8
	1		18/18						Ile			4	8	16
	2			3/3					Ile			8	8	16
	0.5	4/7								Tyr		1	2	2
	1		1/7							Tyr		4	8	8
	1		2/7							Lys		4	8	4
	1		1/7							Phe		4	8	8
	1		3/7*								Tyr	4	8	4
	2			1/3							Tyr	4	8	4
	2			2/3							Asp	4	4	4
	0.5	1/7										1	2	1
	1		1/4*								Tyr	2	2	4
	1		1/4*								Phe	1	2	2
	1		1/4								Tyr	4	8	8
	1		1/4								Phe	4	8	8
	2			1/1							Tyr	16	16	16
2			2/2							Phe	16	16	16	
15762 (GT4 [ST2], GyrB Asn362, 0.25)	0.5	2/7										ND	ND	ND
	0.5	1/7										0.5	1	2
	0.5	4/7*										0.5	1	2
	1		5/8									ND	ND	ND
	1		1/8									ND	ND	ND
	1		1/8									ND	ND	ND
1		1/8									ND	ND	ND	
15527 (GT2 [ST3], GyrB Asn362, 4)	1	12/12										8	8	16
	2		36/36									ND	ND	ND
	8-16			5/6								16	8	16
	8-16			1/6								32	8	16
15527 (GT3 [ST3], GyrB Asn362, 4)	1	12/12										8	8	16
	2		36/36									ND	ND	ND
	8-16			1/2								16	8	16
	8-16			1/2								16	16	32
8619 (GT5 [ST3], GyrB Asn362, 1) ^e	0.5	22/22										1	2	2
	1		3/4									ND	ND	ND
	1		1/4*									32	16	>64
	2			2/2								32	16	>64
	0.5	22/22										1	2	2
	1		12/28									ND	ND	ND
	1		2/28									8	8	16
	1		4/28*									8	8	16
	1		10/28*									8	8	16
	2			2/2								8	8	16
2			2/2								8	8	16	

^a Clones are presented by the name of the parental strain, the subtype, the GyrB phenotype, and the enrofloxacin MIC (µg/ml) at the 1st selection step.
^b Concentration of ENR used to select the different resistant clones during individual passages.
^c Asterisks indicate clones used to perform the following selection step.
^d MICs were evaluated on at least one clone of the selected genotype. When no clone was available in broth culture, MIC assays were not performed. ND, not done.
^e Step 3 was performed using two different clones (same genotype) randomly selected at step 2.

(MIC range of 0.125 to 1 µg/ml), while recent strains, isolated between 2009 and 2014, were moderately susceptible or intermediate to fluoroquinolones (MIC range of 0.25 to 2 µg/ml). However, no mutations in the QRDR region were evidenced that could

explain this loss of susceptibility. The only recurrent mutation that was present in all recent strains and absent from old ones was Asp362Asn, encoded in the *gyrB* QRDR. However, alterations in the *gyrB* gene have rarely been associated with a loss of suscepti-

bility to fluoroquinolones, except in *M. gallisepticum*, where the Asp362Asn substitution was detected once in mutants selected *in vitro* (30). Furthermore, two isolates from Switzerland, included in this study as controls, harbored the same mutation but still remained very sensitive to fluoroquinolones (0.125 to 0.25 µg/ml). These findings suggest that the Asp362Asn mutation in *gyrB* is more likely a molecular marker that discriminates old from recent isolates, as already suggested (8), but does not play a role in isolate susceptibility. Two other mutations, in *parC*, were observed in 3 clinical isolates but were associated with MICs that did not differ from the range for the overall isolate population. These *parC* mutations had previously been described for mutants of nonruminant mycoplasmas selected *in vitro* (28, 30, 31) and had been identified in clinical isolates of *M. bovis* (10, 12). However, only in the case of a concomitant alteration of the GyrA codon for position 83 had they been associated with high resistance (4 to 16 µg/ml).

In the absence of associated alterations of the QRDRs, active efflux is the only known alternative mechanism in mycoplasmas that could lead to acquired resistance to fluoroquinolones and might explain the moderate shift in susceptibility in our set of isolates. It has been described for *M. hominis* strains selected on ethidium bromide *in vitro* (19, 20). *M. hominis* is a human urogenital mycoplasma that belongs to the same phylogenetic group as *M. bovis*, the so-called hominis group. Also, *M. hominis* active efflux has been linked to the overexpression of 2 genes, namely, *md1* and *md2*, encoding multidrug resistance ATP-binding cassette (ABC) transporters that are constitutively expressed in the reference strain (20). In another ruminant mycoplasma, *M. mycoides* subsp. *capri*, it was recently shown that orthovanadate, an inhibitor of ABC efflux pumps, was able to induce a 2-fold decrease of the MICs of 3 fluoroquinolones in both clinical and *in vitro* mutants, suggesting once again the contribution of an efflux mechanism to the overall resistance patterns of isolates (18).

The efflux hypothesis for *M. bovis* is consistent with (i) the presence in the genome of PG45^T of genes encoding several ABC transporters with a predicted role in drug resistance and a multidrug efflux transporter of the MatE family; (ii) the moderate increase of the MICs observed between the recent and old *M. bovis* populations, as efflux systems usually confer low levels of resistance (32, 33); and (iii) the slight differences in the MICs of different fluoroquinolones, as efflux system efficiency usually depends on the hydrophobicity profiles and molecular masses of the extruded fluoroquinolones (34, 35). However, in our set of isolates, we failed to experimentally demonstrate the efflux hypothesis, as we were unable to accumulate enrofloxacin inside mycoplasma cells in a reproducible manner.

Under increased antimicrobial pressure, the selected *M. bovis* clones were able to gain resistance and to achieve higher MICs than those of their parental clinical isolates. In most cases, concomitant alterations were observed in the QRDRs, with the exception of some clones derived from PG45^T (1st step) (Table 2) and 15762 (2nd step) (Table 3) that showed slightly higher MICs despite their WT QRDR genotype. The latter observation is also in favor of a native efflux system that can be upregulated to better allow tolerance of increased antimicrobial concentrations. The point mutations observed in the present study were identical to hot spots for resistance to fluoroquinolones previously described for various mycoplasma species (10, 12, 19, 30, 36, 37). These substitutions included 5 in GyrA (2 in codon 83 [Ser83Phe/Tyr]

and 3 in codon 87 [Glu87Val/Gly/Lys]) and 4 in ParC (1 in codon 80 [Ser80Ile], 1 in codon 98 [Thr98Arg], and 2 in codon 84 [Asp84Asn/Tyr]). The most frequently observed substitutions were Ser83Phe in GyrA and Asp84Asn/Tyr in ParC, leading to 8- to 16-fold increases in the MICs, consistent with results from previous studies of *M. pneumoniae* *in vitro* (28) and *M. bovis* *in vivo* (12). Another combination of mutations was observed less frequently (only 3 of 72 selected clones), namely, Ser83Phe in GyrA and Ser80Ile in ParC, and was associated with 16- to 128-fold increases in the MICs. In contrast to our results, this combination of mutations was reported to occur very frequently *in vitro* for *M. hominis* (28) and for Japanese and Chinese clinical isolates of *M. bovis* (10, 38). Hence, our investigations of *in vitro* resistance selection clearly confirmed the existence of hot spots for mutations conferring high resistance levels and the cumulative effects of mutations in GyrA and ParC on the MICs. We also showed that the sequence in which mutations were accumulated by an isolate could vary as a function of the strain's molecular subtype. The 1st mutation appeared (i) at ParC position 84 for PG45^T (ST1), (ii) at GyrA position 83 for strain 15762 (ST2), (iii) at GyrA when ParC was already mutated in the WT genotype (15488; ST2), and (iv) equally in both genes for strain 15527 or 8619 (both ST3).

Furthermore, the frequency of resistant clone selection was also shown to vary between isolates. The recovery of PG45^T (ST1) and 15762 (ST2) was low during all the selection steps, whereas that of ST3 clones (15527 and 8619) could become high once they had acquired the double mutation in GyrA83 and ParC80/84. ST2 mutants had difficulty in acquiring alterations in QRDRs and failed to mutate in *parC*, and hence to accumulate the *parC* and *gyrA* mutations associated with high-level resistance. In contrast, the ST3 clones easily accumulated mutations leading to high levels of resistance. These results suggest that ST2 isolates are somehow blocked in a configuration which does not facilitate a gain in resistance and could have helped to limit the emergence of resistance in clinical isolates in France, most of which belong to ST2 (8). In contrast, ST3 isolates seemed able to rapidly and efficiently gain a high level of resistance. It is tempting to speculate that ST3 isolates are able to counteract the fitness loss associated with topoisomerase mutations. Whether they have increased mutation rates due to deficient DNA repair systems, which could facilitate the acquisition of compensatory mutations, has yet to be investigated. This hypothesis does not exclude the contribution of efflux systems to the early steps toward resistance.

The recent increased prevalence of ST3 isolates, from 5 to 20%, in the French *M. bovis* population supports this hypothesis. Indeed, the selective pressure imposed by the use of antimicrobials might result in the selection of this subtype that used to be rare (8). Furthermore, the highly resistant clinical isolate detected in 2014 (isolate 8428), with an MIC of 16 µg/ml for ENR and DAN and of >64 µg/ml for MAR, harbored the same mutations as the *in vitro* mutants (Ser83Phe in GyrA and Ser80Ile in ParC) and was of the ST3 subtype. This nicely emphasizes the need to survey the selection and spread of ST3 strains in France. Actually, this subtype was already described in Switzerland and Austria (8) and in the United States, as early as 2000 and 2002 (13, 21). Whether it was imported into France through international cattle trade has yet to be ascertained. Direct importation is unlikely, since according to the history of U.S. cattle trade (<http://www.ers.usda.gov/data-products/livestock-meat-international-trade-data.aspx>), only approximately

1,000 heads of cattle have been exported from the United States to Europe since 2002, and never to France.

Conclusions. This study attempted to decipher the molecular mechanisms responsible for the moderate decrease in susceptibility of recent French clinical isolates of *M. bovis* to fluoroquinolones. No direct link was established between QRDR polymorphisms and the shift in MIC values between old and recent isolates. Although an efflux system appears to be the most probable mechanism behind the observed phenotypes, our investigations *in vitro* were inconclusive. However, we showed that different clinical isolates, with different initial MICs and different genetic subtypes, were not equal in the ability to gain resistance *in vitro*. Notably, isolates belonging to the subtype 3 cluster were more likely to rapidly accumulate mutations in their QRDRs under selective pressure *in vitro* and hence to become resistant. These results are congruent with *in vivo* observations, as the first resistant clinical isolate reported in France was shown to belong to subtype 3. The relative potential contributions of (i) active efflux pumps and (ii) increased mutation rates leading to compensatory mutations to the process of developing resistance to fluoroquinolones in ST3 have yet to be explored. Lastly, the increasing prevalence of subtype 3 observed in the French population of *M. bovis* isolates strongly indicates an urgent need to control the veterinary usage of fluoroquinolones in France in order to preserve the favorable epidemiological situation there, where the level of resistance to fluoroquinolones is only moderate.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Agnès Tricot for her excellent technical assistance, Patrice Cuchet for performing membrane filtration-dot identification of isolates, François Poumarat for providing clinical isolates with known MICs, and all the members of the VIGIMYC network for supplying several *M. bovis* isolates with documented clinical histories. We are also grateful to Paola Pilo, who kindly provided isolates from Switzerland.

Dima Khalil's Ph.D. thesis is jointly funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) and the Institute of Higher Education in Food Science, Animal Health, Agricultural and Environmental Sciences (VetAgro Sup).

REFERENCES

- Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED. 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J Vet Intern Med* 25:772–783. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0750.x>.
- Rerat M, Albini S, Jaquier V, Hussy D. 2012. Bovine respiratory disease: efficacy of different prophylactic treatments in veal calves and antimicrobial resistance of isolated *Pasteurellaceae*. *Prev Vet Med* 103:265–273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.09.003>.
- Soehnen MK, Aydin A, Lengerich EJ, Houser BA, Fenton GD, Lyszczek HR, Burns CM, Byler LI, Hattel AL, Wolfgang DR, Jayarao BM. 2011. Blinded, controlled field trial of two commercially available *Mycoplasma bovis* bacterin vaccines in veal calves. *Vaccine* 29:5347–5354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.092>.
- O'Connor AM, Coetzee JF, da Silva N, Wang C. 2013. A mixed treatment comparison meta-analysis of antibiotic treatments for bovine respiratory disease. *Prev Vet Med* 110:77–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.025>.
- Gautier-Bouchardon AV, Ferre S, Le Grand D, Paoli A, Gay E, Poumarat F. 2014. Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PLoS One* 9:e87672. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087672>.
- Kroemer S, Galland D, Guerin-Fauble V, Giboin H, Woehrl-Fontaine F. 2012. Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Vet Rec* 170:53. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.100246>.
- Nickell JS, White BJ. 2010. Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:285–301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.006>.
- Becker CA, Thibault FM, Arcangioli MA, Tardy F. 2015. Loss of diversity within *Mycoplasma bovis* isolates collected in France from bovines with respiratory diseases over the last 35 years. *Infect Genet Evol* 33:118–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.019>.
- Ayling RD, Rosales RS, Barden G, Gosney FL. 2014. Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain. *Vet Rec* 175:486. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.102303>.
- Sato T, Okubo T, Usui M, Higuchi H, Tamura Y. 2013. Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves. *J Vet Med Sci* 75:1063–1065. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.12-0508>.
- Thomas A, Nicolas C, Dizier I, Mainil J, Linden A. 2003. Antibiotic susceptibilities of recent isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium. *Vet Rec* 153:428–431. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.153.14.428>.
- Lysnyansky I, Mikula I, Gerchman I, Levisohn S. 2009. Rapid detection of a point mutation in the *parC* gene associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4911–4914. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00703-09>.
- Rosenbusch RF, Kinyon JM, Apley M, Funk ND, Smith S, Hoffman LJ. 2005. In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. *J Vet Diagn Invest* 17:436–441. <http://dx.doi.org/10.1177/104063870501700505>.
- Sulyok KM, Kreizinger Z, Fekete L, Hrivnak V, Magyar T, Janosi S, Schweitzer N, Turcsanyi I, Makrai L, Erdelyi K, Gyurancz M. 2014. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe. *BMC Vet Res* 10:256. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-014-0256-x>.
- Uemura R, Sueyoshi M, Nagatomo H. 2010. Antimicrobial susceptibilities of four species of *Mycoplasma* isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. *J Vet Med Sci* 72:1661–1663. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.10-0165>.
- Ayling RD, Baker SE, Peek ML, Simon AJ, Nicholas RA. 2000. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet Rec* 146:745–747. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.146.26.745>.
- Waite KB, Lysnyansky I, Bébéar CM. 2014. Emerging antimicrobial resistance in mycoplasmas of humans and animals, p 289–322. In Browning GF, Citti C (ed), *Mollicutes—molecular biology and pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Antunes NT, Assuncao P, Poveda JB, Tavio MM. 2015. Mechanisms involved in quinolone resistance in *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Vet J* 204:327–332. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.018>.
- Raherison S, Gonzalez P, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM. 2002. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:672–679. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.3.672-679.2002>.
- Raherison S, Gonzalez P, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM. 2005. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:421–424. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.1.421-424.2005>.
- Register KB, Thole L, Rosenbush RF, Minion FC. 2015. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma bovis* reveals host-specific genotypes in cattle versus bison. *Vet Microbiol* 175:92–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.002>.
- Chazel M, Tardy F, Le Grand D, Calavas D, Poumarat F. 2010. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet Res* 6:32. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-6-32>.
- Poumarat F, Perrin B, Longchambon D. 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet Microbiol* 29:329–338. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90140-B](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(91)90140-B).
- Marenda MS, Sagne E, Poumarat F, Citti C. 2005. Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiology* 151:475–489. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27590-0>.
- Aebi M, Bodmer M, Frey J, Pilo P. 2012. Herd-specific strains of *Myco-*

- plasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Vet Microbiol* 157:363–368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.006>.
26. Poumarat F, Longchambon D, Martel JL. 1992. Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within “*M. mycoides* cluster” and within “glucose and arginine-negative cluster” of ruminant mycoplasmas. *Vet Microbiol* 32:375–390.
 27. Hannan PC. 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. *Vet Res* 31:373–395.
 28. Gruson D, Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM. 2005. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1190–1193. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.3.1190-1193.2005>.
 29. Chen WP, Kuo TT. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21:2260. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/21.9.2260>.
 30. Reinhardt AK, Bebear CM, Kobisch M, Kempf I, Gautier-Bouchardon AV. 2002. Characterization of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV involved in quinolone resistance of *Mycoplasma gallisepticum* mutants obtained in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 46:590–593. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.2.590-593.2002>.
 31. Bebear CM, Renaudin J, Charron A, Renaudin H, de Barbeyrac B, Schaefferbeke T, Bebear C. 1999. Mutations in the *gyrA*, *parC*, and *parE* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:954–956.
 32. Poole K. 2000. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2595–2599. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.10.2595-2599.2000>.
 33. Ferrandiz MJ, Oteo J, Aracil B, Gomez-Garces JL, De La Campa AG. 1999. Drug efflux and *parC* mutations are involved in fluoroquinolone resistance in viridans group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2520–2523.
 34. Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA. 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1086–1094. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.37.5.1086>.
 35. Piddock LJ, Jin YF, Griggs DJ. 2001. Effect of hydrophobicity and molecular mass on the accumulation of fluoroquinolones by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 47:261–270. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/47.3.261>.
 36. Bebear CM, Grau O, Charron A, Renaudin H, Gruson D, Bebear C. 2000. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase (*gyrA*) gene from *Mycoplasma hominis* and characterization of quinolone-resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2719–2727. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.10.2719-2727.2000>.
 37. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Bove JM, Bebear C, Renaudin J. 1998. Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2304–2311.
 38. Mustafa R, Qi J, Ba X, Chen Y, Hu C, Liu X, Tu L, Peng Q, Chen H, Guo A. 2013. In vitro quinolones susceptibility analysis of Chinese *Mycoplasma bovis* isolates and their phylogenetic scenarios based upon QRDRs of DNA topoisomerases revealing a unique transition in ParC. *Pak Vet J* 33:364–369.

Supplementary Table 1: List of *M. bovis* clinical isolates used in this study, their subtype, fluoroquinolones susceptibility and QRDRs polymorphism.

name/no.	date	isolates		"département" clinical signs	subtypes		MIC (µg/mL)		QRDRs genotypes ^a				
		country			Register ^{et al.}	Becker <i>et al.</i>	enrofloxacin	danofloxacin	marbofloxacin	Ref. ^c	GyrA Ser 83	GyrB Asp 362	ParC Ser 80
PG45	1962	USA	-	Mastitis	17	ST1	0.25	0.5	1	/	/	/	/
15781	1978	France	38	BRD	17	ST1	0.25	0.5	2	/	/	/	/
15786	1978	France	68	BRD	nd	ST1	0.25	0.5	2	/	/	/	/
15810	1978	France	61	BRD	nd	ST1	0.25	1	2	/	/	/	/
15797	1978	France	2	BRD	nd	ST1	0.25	0.5	2	/	/	/	/
15778	1978	France	1	BRD	17	ST1	0.25	0.25	2	/	/	/	/
15819	1978	France	25	BRD	nd	ST1	0.25	0.5	2	/	/	/	/
15818	1979	France	14	BRD	17	ST1	0.25	0.5	2	/	/	/	/
15775	1979	France	46	BRD	nd	ST1	0.25	0.5	2	/	/	/	/
15783	1979	France	54	BRD	nd	ST1	0.25	0.5	2	/	/	/	/
15800	1979	France	1	BRD	17	ST1	0.25	0.5	2	/	/	/	/
1067	1983	France	56	Mastitis	17 ^b	ST1	0.125	0.5	1	/	/	/	/
15335	2009	France	82	BRD	nd	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15344	2009	France	54	BRD	nd	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15488	2010	France	56	BRD	nd	ST2	1	2	1	/	Asn	lle	/
15508	2010	France	79	BRD	18	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15472	2010	France	56	BRD	18	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15357	2010	France	81	BRD	nd	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15360	2010	France	41	BRD	nd	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15525	2010	France	44	BRD	nd	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15527	2011	France	31	BRD	5	ST3	0.5	2	1	/	Asn	/	/
15711	2011	France	22	BRD	18	ST2	0.5	0.25	1	/	Asn	/	/
15539	2011	France	85	BRD	18	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15689	2011	France	21	BRD	nd	ST2	1	2	1	/	Asn	/	Tyr
15875	2012	France	31	BRD	nd	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15876	2012	France	1	BRD	nd	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
15881	2012	France	31	BRD	nd	ST2	0.5	2	1	/	Asn	/	Tyr
15759	2012	France	60	BRD	nd	ST2	0.5	0.5	1	/	Asn	/	/
15760	2012	France	69	BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
15761	2012	France	17	BRD	nd	ST2	0.5	1	1	/	Asn	/	/
15762	2012	France	85	BRD	18	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
15769	2012	France	3	BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
7750	2013	France	85	BRD	5	ST3	0.5	0.5	1	/	Asn	/	/
7866	2013	France	44	Arthritis, BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
7939	2013	France	50	BRD	nd	ST2	0.5	1	1	/	Asn	/	/
8127	2013	France	65	BRD	18	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
8181	2013	France	50	Otitis	nd	ST2	0.5	1	2	/	Asn	/	/
8428	2013	France	46	BRD	5	ST3	16	>64	1	/	Asn	/	/
8550	2013	France	50	BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Phe	lle	/
8065	2014	France	42	BRD	5	ST3	0.25	0.25	1	/	Asn	/	/
8619	2014	France	44	BRD	5	ST3	0.25	0.5	1	/	Asn	/	/
8986	2014	France	79	BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
9019	2014	France	61	Mastitis	nd	ST2	0.5	0.5	1	/	Asn	/	/
9035	2014	France	46	BRD	nd	ST2	0.5	1	1	/	Asn	/	/
9043	2014	France	15	BRD	nd	ST2	0.25	0.5	1	/	Asn	/	/
9072	2014	France	85	BRD	18	ST2	0.25	0.5	1	/	Asn	/	/
9185	2014	France	35	BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
9190	2014	France	31	BRD	nd	ST2	0.5	0.5	1	/	Asn	/	/
9212	2014	France	03	BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
9334	2014	France	42	BRD	nd	ST2	0.5	0.5	1	/	Asn	/	/
9392	2014	France	28	BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
9447	2014	France	64	BRD	nd	ST2	0.25	1	1	/	Asn	/	/
9471	2014	France	50	BRD	nd	ST2	0.5	0.5	1	/	Asn	/	/
Pétunia	2010	Switzerland	-	BRD	nd	ST3	0.125	0.25	1	/	Asn	/	/
Somalia	2010	Switzerland	-	BRD	nd	ST3	0.25	0.5	1	/	Asn	/	/

^a *E. coli* numbering / , Wild type; nd, not determined

^b One nucleotide is different in the *gpsA* locus

^c 1, this study; 2, Gautier-Bouchardon *et al.*, 2014

CHAPITRE 2

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14 **CHAPITRE 2: Monitoring the decrease in susceptibility**
15 **to ribosomal RNAs targeting antimicrobials and its**
16 **molecular basis in clinical *Mycoplasma bovis* isolates**
17 **over time**

18

19 **Dima Khalil^{1,2}, Claire Becker^{2,1}, Florence Tardy^{1,2}**

20 ¹Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France

21 ²Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy L'Etoile,
22 France

23

24 Article accepté dans MDR (Microbial Drug Resistance) le 5 janvier 2017
25 sous l'ID : **MDR-2016-0268**

26

27

28

29

30

31

32

33

34 Monitoring the decrease in susceptibility to ribosomal RNAs
35 targeting antimicrobials and its molecular basis in clinical
36 *Mycoplasma bovis* isolates over time

37

38 Authors

39 Dima Khalil^{1,2}, Claire A.M. Becker^{1,2}, Florence Tardy^{2,1#}

40 ¹Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy L'Etoile,
41 France

42 ² Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France,

43 # Corresponding author: Florence Tardy, Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses
44 des Ruminants, 31 Avenue Tony Garnier 69364 Lyon cedex 07, France. Tel + 33 4 78 69 68
45 43, fax + 33 4 78 61 91 45; e-mail: florence.tardy@anses.fr

46

47 Keywords: drug resistance, mycoplasma, macrolides, tetracyclines

48 Running title: *M. bovis* resistance to macrolides and tetracyclines

49 **Abstract**

50 *Mycoplasma bovis* is considered an emerging threat to bovine production in industrialized
51 countries. Its control depends on good husbandry and efficient chemotherapy practices. In
52 France, clinical isolates collected after 2009 showed a drastic loss of susceptibility to most
53 antimicrobials when compared to isolates collected in 1978-1979. The aim of the present
54 study was to analyze the molecular mechanisms underlying the shift towards resistance to

55 macrolides and tetracyclines and to assess whether the clinical origin of the isolates or their
56 molecular subtypes could have influenced their pattern of evolution.

57 We demonstrated that all *M. bovis* isolates collected as early as 2000 should already be
58 considered resistant to tylosin, tilmicosin and oxytetracycline, whatever the associated
59 clinical signs. The shift toward resistance happened earlier for oxytetracycline and more
60 progressively for tylosin/tilmicosin. Isolates belonging to the major subtype ST2 (n=40)
61 showed a homogeneous genotype for resistance, with combined alterations of G₇₄₈A and
62 A₂₀₅₈G in the 23S rRNA alleles for tylosin/tilmicosin and of A₉₆₅T and A₉₆₇T in the 16S rRNA
63 alleles for oxytetracycline. The genotypes of ST3 or ST1 isolates (n=9 and 25, respectively) in
64 the process of becoming resistant were more varied. In recent years, the convergence of
65 both ST2 and ST3 isolates toward the same resistance genotype suggests that the
66 corresponding mutations have been selected for providing an appropriate balance between
67 fitness cost and resistance.

68

69 **Introduction**

70 It has recently become evident that mycoplasmas are no exception to the dramatic increase
71 in the overall resistance of bacteria to antimicrobials worldwide. These particular bacteria,
72 characterized by a small genome and small cell-size, are important pathogens in both human
73 and veterinary medicine. Due to their lack of a cell-wall, they are naturally resistant to β -
74 lactams and glycopeptides. Furthermore losses in susceptibility to drugs such as
75 tetracyclines, fluoroquinolones and macrolides have been extensively reported during the
76 past decade in many clinically relevant species. A data compilation, on phenotypic resistance
77 and the underlying molecular mechanisms in mycoplasmas of both human and animal origin,

78 is provided in the recent review by Waites et al ¹. Marked differences in this recent evolution
79 toward resistance are apparent, depending on the mycoplasmal species, the animal host,
80 the antimicrobial exposure of the concerned population and the country of origin of the
81 isolates. For instance, the acquired resistance to tetracyclines in *Mycoplasma (M.) hominis*, a
82 genital human mycoplasma occasionally involved in infections, has long been known and
83 associated with the tet(M) determinant carried on the conjugative transposon Tn916, but
84 has not yet been reported in *M. pneumoniae*, the causative agent of community-acquired
85 respiratory tract infections in children and young adults ^{2,3}. Acquired resistance to
86 macrolides in human mycoplasmas is still regarded as a rare and geographically-localized
87 phenomenon, like *M. pneumoniae* in Asia ^{1,3} while in animals, the rapid emergence of
88 resistant isolates has been reported in different species with a highly critical situation in the
89 bovine mycoplasma, *M. bovis* ^{1,2}. Indeed as summarized in a recent article by Heuvelink et al.
90 ⁴ the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of macrolides for almost all the *M. bovis*
91 isolates collected after the year 2000, worldwide, were > 64 µg/ml.

92 Amongst the many species of mycoplasmas of veterinary importance, *M. bovis* is considered
93 as an emerging threat to livestock production in industrialized countries ⁵. It is a pathogen of
94 cattle mainly responsible for bronchopneumonia in young animals but also for other clinical
95 manifestations e.g. mastitis, otitis and arthritis of varied importance in different countries⁶.
96 In the absence of effective vaccines ^{7,8}, the control of *M. bovis* mycoplasmosis relies on good
97 husbandry practices and efficient antimicrobial treatments. However in bovine respiratory
98 diseases, frequent co-infections with other microorganisms, are associated with diverse
99 levels of infection severity ⁹ and lead to the frequent use of multiple antimicrobials, mainly
100 penicillins, cephalosporins, tetracyclines, macrolides and quinolones ¹⁰. *Mycoplasma* mastitis
101 and arthritis in cattle are considered poorly responsive to chemotherapy and in the absence

102 of a specific *Mycoplasma* diagnosis these clinical signs are often treated with betalactams as
103 a primary strategy^{6,11}.

104 Tetracyclines and macrolides are classes of antimicrobials widely used in veterinary
105 medicine, and especially in ruminants. They are both bacteriostatic drugs that block protein
106 synthesis by i) preventing linkage of aminoacyl-tRNA to the acceptor site through binding to
107 the 30S ribosomal subunit involving 16S rRNA for tetracyclines^{12,13} or ii) causing premature
108 dissociation of peptidyl-tRNA from the ribosome by binding to domains II and V of 23S
109 ribosomal RNA in the 50S ribosomal subunit for macrolides^{14,15}. The pharmacokinetic
110 properties of macrolides enable them to concentrate and persist in tissues, especially the
111 lungs, thus justifying the use of a single dose for the semisynthetic tilmicosin and
112 tulathromycin¹⁴. Hence macrolide-based drugs often have a specific indication for *M. bovis*,
113 a common agent of bovine respiratory disease, while tetracycline-based chemotherapy has a
114 broader target such as septicemia, respiratory, digestive or reproductive disorders due to
115 susceptible bacteria in cattle. In general, tetracyclines are widely used in food animals as first-
116 line drugs, for their low cost, ease of use and wide range of action¹². The index of veterinary
117 drugs authorized in France can be consulted at <http://www.ircp.anmv.anses.fr/>.

118 As expected from the intensive use of antimicrobials, reports of an in vitro decrease in the
119 susceptibility of *M. bovis* to several antimicrobial classes have started to accumulate
120 worldwide⁴. In France, all clinical isolates collected between 2009 and 2012 were shown to
121 have gained resistance to all antimicrobials except fluoroquinolones when compared to
122 isolates dating back to 1978-1979¹⁶. This emergence of isolates with reduced susceptibility
123 was further linked to the spread of a homogeneous population of strains with poor genetic
124 diversity, belonging to a major subtype¹⁷. The only antimicrobial family spared was the

125 fluoroquinolones, although a first clinical isolate with increased MIC was identified in 2013
126 ¹⁸. In the absence of susceptibility breakpoints for *M. bovis*, the clinical interpretation of in
127 vitro results is often not possible. However breakpoints available for other bacteria
128 responsible for respiratory diseases in cattle can be used for approximation ¹⁹. For instance,
129 the mean MICs for macrolides and tetracyclines in all recent isolates from France were
130 greater than the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints proposed for
131 *Pasteurellaceae* and hence could be considered resistant ¹⁶. The mechanisms behind this loss
132 of susceptibility have not been examined for French isolates and only a few studies have
133 been conducted so far on the resistance mechanisms to macrolides and tetracyclines in *M.*
134 *bovis* ²⁰⁻²². These studies essentially reported sequence alterations in 23S (domains II and V)
135 and 16S rRNAs, respectively. More precisely the A₂₀₅₈G substitution (*Escherichia coli*
136 numbering) in domain V of 23S rRNA already described in *M. pneumoniae* ^{3,21}, is reported for
137 macrolides. Resistance to tetracyclines was associated with two (A₉₆₅ and A₉₆₇) or three
138 positions (A₉₆₅, A₉₆₇, and G₁₀₅₈) mutations in the two 16S rRNA copies, as already shown for
139 other human mycoplasmas ^{20,23}. Various other mutations in ribosomal proteins L4 and L22
140 were also identified that had been recently associated with the decreased binding of
141 macrolides to ribosomal subunits ²⁴.

142 The present study was conducted to examine the evolution over time of the emergence of
143 *M. bovis* isolates with increased MICs for two 16-membered-macrolides dedicated to
144 veterinary use (tylosin and tilmicosin) and tetracyclines (oxytetracycline). Sequence analyses
145 were conducted to link alterations in the target regions of 16S rRNA (*rrs* alleles), 23S rRNA
146 (*rrl* alleles), L4 and L22 proteins (encoded by *rpID* and *rpIV*, respectively) with resistance
147 phenotypes. The objective was to understand the time lapse and molecular mechanisms
148 underlying the previously observed shift from a highly susceptible population in 1978-1979

149 to a highly resistant one in 2012 ¹⁶. Isolates were grouped according to clinical signs
150 (respiratory disease versus other origins) to determine whether differences in therapeutic
151 practices and antimicrobials uses could influence the susceptibility profiles. All isolates were
152 further subtyped by a single locus sequence typing approach ¹⁷ to establish their
153 epidemiological relationships and hence the main evolutionary trends within the *M. bovis*
154 population in France.

155

156 **Materials and methods**

157 *Mycoplasma isolates, growth, identification and subtyping*

158 Seventy-four *M. bovis* clinical isolates collected from 31 “départements” of France were
159 included in this study. They originated from a collection maintained in Anses Lyon and
160 mostly derived from the French national surveillance network for mycoplasmoses of
161 ruminants (VIGIMYC) ²⁵. They were isolated from young cattle with respiratory diseases (40
162 isolates, Table 1) or from cattle with non-respiratory clinical signs such as mastitis (n=15),
163 otitis (n=4), arthritis (n=11) or unknown (n=4) (Supplementary Table 1). The type strain
164 PG45^T (isolated in the USA in 1962 from a mastitis case) and two isolates from Switzerland
165 (collected in 2010 from cases of respiratory disease ²⁶) were added as external controls. All
166 isolates were grown in PPLO broth or agar, modified as described previously ²⁷, at 37°C in 5%
167 CO₂. To standardize the mycoplasma inocula used for MIC tests (see hereafter), the number
168 of CFU per ml was determined by plating 2 µl of serial 10-fold broth dilutions onto agar
169 plates. After incubation for 3 days, the colonies for dilutions resulting in countable, non-
170 confluent spots were counted using a stereomicroscope and the mean final cell
171 concentration was determined using two dilutions that resulted in cell-count within a range

172 comprised between 10 to 300. Isolates were identified by membrane filtration dot-
173 immunobinding tests²⁸ and by a species-specific PCR assay targeting the *poIC* gene²⁹. They
174 were further subtyped by single-locus sequence analysis (a 486 bp region of the *poIC* gene),
175 that had been shown to provide relevant typing results¹⁷. The primers and PCR conditions
176 used for these assays are listed in Supplementary Table 2.

177

178 *Minimum inhibitory concentration (MIC) assays*

179 For respiratory isolates, the MICs of tylosin, tilmicosin and oxytetracycline, all purchased
180 from Sigma-Aldrich France, were determined using the agar dilution method on modified
181 PPLO agar, as described previously^{16,18}. In brief, 1 µl of each strain diluted to 10⁴–10⁵
182 CFU/ml was spotted onto agar plates containing serial twofold dilutions of each
183 antimicrobial (from 0.25 to 512 µg/ml for macrolides; from 0.25 to 64 µg/ml for
184 oxytetracycline) and grown at 37°C in 5% CO₂ for 5 days. The MIC was defined as the lowest
185 antimicrobial concentration causing 100% inhibition of growth after the incubation period³⁰.
186 MIC assays were performed at least twice and three times in case of different MIC values for
187 each isolate and the MIC values given in the results section are the mode of the different
188 values. For isolates collected from non-respiratory cases, only 1 to 3 different concentrations
189 were used per antimicrobial. These concentrations corresponded to the epidemiological cut-
190 off determined on the basis of the MIC distributions for each antimicrobial and our set of
191 respiratory isolates used as reference (Fig. 1). They were 8 µg/ml for oxytetracycline and 16
192 µg/ml for tilmicosin and tylosin. They were identical to the CLSI breakpoints defined for
193 *Pasteurellaceae* for tilmicosin and tetracyclines³¹ and to the general MIC breakpoint
194 proposed for tetracyclines in the review by Hannan³⁰. Two supplementary concentrations of

195 1 and 256 µg/ml were added to better discriminate isolates that were respectively highly
196 susceptible or resistant, to macrolides.

197

198 *PCR amplification and sequence analysis of rrs3, rrs4, rrl3, rrl4, rplD and rplV genes*

199 Genomic DNA was extracted from 2 ml logarithmic-phase broth cultures of *M. bovis* using a
200 commercial kit (Blood and tissue kit, Qiagen France). Because of the duplication of the 16S
201 rRNA/23S rRNA locus in *M. bovis* PG45^T, a nested PCR approach was developed to
202 specifically amplify each individual copy (Fig. 2). Three long range PCRs were first run on
203 genomic DNA. These included two previously described assays using primers MB-282-F /
204 MB-rrl-3R and MB-rrl-II-F / MB-287-R ²¹ to generate PCR products 1 and 2 and a third home-
205 designed PCR that targets the 2nd copy of 16S rRNA and part of the 1st 23S rRNA copy, using
206 primers 23S-V1-F and U8 (PCR 3 in Fig. 2). PCR products 1 to 3 were then used as template,
207 after 1/100 dilution, to run the several nested PCRs listed in Supplementary Table 2. Genes
208 encoding ribosomal proteins, *rplD* and *rplV* for proteins L4 and L22, respectively, were
209 tentatively amplified using the protocol proposed by Lerner *et al.* ²¹. However in our
210 experimental set up using the GoTaq from Promega (France), we failed to obtain a single
211 amplicon using MB-L4-F and MB-L4-R primers. Hence two new primers (L4F and L4R) were
212 designed. Details of the individual PCR run conditions are given in Supplementary Table 2.
213 PCR products corresponding to individual copies of each rRNA and domain were sequenced
214 using an external facility at Beckman Coulter Genomics (Genewiz, United Kingdom). The
215 length and nucleotide upper and lower boundaries of the analyzed sequences (positioned in
216 Fig. 2) are given in Supplementary Table 2. Sequence editing, consensus and alignment
217 construction were performed using Seaview software
218 (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>) and Geneious version 6.1.8

219 (<http://www.geneious.com>). For convenience, the nucleotide numbering refers to that of *E.*
220 *coli* and the amino acid numbering for the L4 and L22 proteins to that of *M. bovis* PG45^T. For
221 the second set of isolates, only 26 out of 34 isolates, selected as representing the different
222 subtypes and MIC levels, were analyzed for their genotype resistance.

223

224 **Results**

225 *Distribution of MICs for isolates from respiratory diseases*

226 A set of 40 clinical isolates of *M. bovis*, collected between 1978 and 2014, exclusively from
227 respiratory diseases, was assembled from our collection (Table 1). These isolates were
228 epidemiologically unrelated as they originated from different outbreaks, different regions
229 and years. Isolates collected between 1978 and 1997 (n=14) are hereafter named “old”
230 while those collected from 2000 to 2014 (n=26) were named “recent”. Two isolates collected
231 in 2010 from neighboring Switzerland were added as external controls ²⁶.

232 The susceptibility of these 40 isolates to the 16-membered macrolides, tylosin and
233 tilmicosin, and to oxytetracycline was determined by MIC assays using the agar dilution
234 method according to the recommendations of the CLSI ³¹. The type strain, PG45^T with known
235 MICs was used as a quality control in each assay. It was confirmed to be mainly susceptible
236 with MIC values of 1 µg/ml for tylosin, tilmicosin and oxytetracycline (black arrows in Fig. 1).
237 The distribution of the MIC values of tylosin, tilmicosin and oxytetracycline for French
238 isolates is shown in Fig. 1 where old isolates are represented by grey bars and recent isolates
239 by white bars. This representation clearly illustrates the shift over time toward less
240 susceptible isolates, although the first isolates with increased MICs for both oxytetracycline
241 and macrolides were isolated as early as 1979. For all recent isolates from France the MICs

242 of tilmicosin and oxytetracycline were greater than the CLSI breakpoints proposed for
243 *Pasteurellaceae* and hence could be considered resistant (Fig.1). The MIC distribution of
244 tylosin, for which no interpretation breakpoints are available, highlighted four different
245 groups of isolates. Old ones were scattered in three populations, one between 0.5 and 1
246 $\mu\text{g/ml}$ for very sensitive isolates (8/14), a second between 4 to 16 $\mu\text{g/ml}$ for intermediate
247 isolates (4/14) and a third between 64 to 128 $\mu\text{g/ml}$ (2/14). In contrast all recent isolates,
248 except one (namely, isolate no. L11780, collected in 2000 with an MIC of 8 $\mu\text{g/ml}$;
249 highlighted by a star in Fig. 1), had MICs above or equal to 128 $\mu\text{g/ml}$, most (24/26) being
250 highly resistant with MICs $\geq 512\mu\text{g/ml}$. The overall distribution of tilmicosin MICs was similar
251 except that no intermediate isolates, according to the MIC breakpoints proposed by the CLSI,
252 were observed and two old isolates, collected in 1993 and 1996, were already highly
253 resistant with an MIC $> 512 \mu\text{g/ml}$. For recent isolates all MICs of tilmicosin were ≥ 512
254 $\mu\text{g/ml}$, except the isolate collected in 2000 that had an MIC of 128 $\mu\text{g/ml}$. In contrast, for
255 oxytetracycline, the distinction between old and recent isolates was less evident as most of
256 the old isolates (11/14) should be classified as resistant using the general MIC breakpoints
257 for cattle respiratory disease bacteria from CLSI ($\geq 8 \mu\text{g/ml}$). Only three old isolates should
258 be considered as susceptible (L7641, MIC $\leq 2 \mu\text{g/ml}$) or intermediate (L2068 and L9766, MIC
259 = 4 $\mu\text{g/ml}$). All recent isolates were also resistant with MIC values $\geq 32 \mu\text{g/ml}$. The two Swiss
260 isolates fell into the category of recent French isolates with MIC values of 64-256 $\mu\text{g/ml}$ for
261 tylosin, 512 $\mu\text{g/ml}$ for tilmicosin and 64 $\mu\text{g/ml}$ for oxytetracycline (open arrows in Fig. 1).

262

263 *Ribosomal targets polymorphism*

264 In order to elucidate the molecular basis underlying the different susceptibilities of old and
265 recent isolates, the sequences of domains II and V of the 23S rRNA, ribosomal proteins L4

266 and L22, targeted by macrolides, and of the 16S rRNA, targeted by tetracyclines, were
267 analyzed. In each case, these sequences cover the main binding sites and already-described
268 hot spots for mutations conferring resistance (Fig. 2). Either already described PCR assays or
269 newly designed ones were used. The design of the new primer sets was based on the
270 sequence of the type strain PG45^T which harbors two copies of the *rrl* gene encoding 23S
271 rRNA and the *rrs* gene encoding 16S rRNA. The PCR results showed that all our clinical
272 isolates also had two *rrs* and *rml* alleles. Several nucleotide substitutions were observed in all
273 contemporary isolates and in some old ones (Table 1). For the 23S rRNA, two positions were
274 notably altered in both *rml* alleles in a large majority of the recent isolates (23/26), namely
275 G₇₄₈A in domain II and A₂₀₅₈G in domain V. These positions have already been described as
276 mutation hot spots in *M. bovis* and other mycoplasma species^{1,21,22,32}. Another mutation,
277 G₉₅₄A was observed in recent isolates but only in one copy of 23S rRNA (namely *rml* 3) but
278 had never been reported before as a hot spot^{1,32}. Interestingly only a few old isolates (3/14)
279 showed the G₇₄₈A or A₂₀₅₈G alterations and none had accumulated both point mutations. A
280 few amino acid alterations were observed in the L4 and L22 proteins, namely G₁₈₅R and
281 Q₉₃H/K, and were cumulated only in two recent isolates and in one old isolate. Regarding the
282 two 16S rRNA copies (*rrs* 3 & *rrs* 4), several nucleotide polymorphisms were observed in five
283 different positions (Table 1). However, they were recurrent only at positions 965 and 967 in
284 both the old (9/14) and recent isolates (26/26). These two positions had previously been
285 described as hot spots for mutation²⁰. Another repeated mutation point, G₁₀₅₈A, was
286 observed in old isolates (4/14) and in only one recent isolate collected in 2000.

287

288 *Relationship between gene alterations in ribosomal targets, MIC values and isolates subtypes*

289 The different subtypes of the isolates were also investigated to determine the potential link
290 between resistant phenotypes, genotypes and the molecular subtypes. These isolate
291 subtypes were either already available from a previous study or were determined here using
292 the same approach, *i.e.* sequence analysis of their *poIC* locus¹⁷. The resulting overall profiles
293 (including subtype, level of susceptibility and resistance genotype) are compared in Fig. 3. As
294 expected from previous results^{17,18}, all strains isolated before 1999 were homogeneously
295 grouped in subtype 1 (ST1, n=14) with the type strain PG45^T, while almost all strains isolated
296 after 2000 (20/26) belonged to subtype 2 (ST2), which diverged from ST1 by a single SNP in
297 the 486 bp *poIC* locus. Two strains, isolated in 2000, had different profiles, one being ST1 and
298 the other ST2, which confirmed previous results that suggested a change in the overall *M.*
299 *bovis* population in France around 2000¹⁷. Five of the recent isolates (> 2000), and the two
300 Swiss strains (isolated in 2010), belonged to ST3, an uncommon subtype characterized by 16
301 SNPs¹⁷.

302 The resistance genotypes and MIC values of the ST2 isolates appeared to be more
303 homogeneous than those of the ST1 isolates (Fig. 3). The ST1 isolates were collected in years
304 when resistance to antimicrobials targeting ribosomal RNAs was just emerging and hence
305 showed more genetic diversity. At the time of the switch to the ST2-lineage (around year
306 2000) all isolates had become highly resistant (MICs higher than 256 µg/ml for macrolides
307 and higher than or equal to 32 µg/ml for oxytetracycline) and shared 10 to 12 common
308 single nucleotide substitutions in the 23S rRNA and 16S rRNA alleles. These substitutions
309 include hot spots mutations (dark-grey squares), previously described in other mycoplasma
310 species^{23,33,34} and in *M. bovis* isolated in other countries²⁰⁻²². Other nucleotide substitutions
311 (light-grey squares) were also observed in the target genes but outside, although close to,
312 the main target domains. They had never before been correlated with resistance^{1,35} but are

313 mentioned in Fig. 3 when they occurred in more than 3 isolates (included those from non-
314 respiratory disease). In summary, our results clearly illustrate the shift from a susceptible
315 population with few mutations (ST1-lineage) to a resistant population (ST2-lineage) with
316 cumulated mutations in both alleles of 16S rRNA and 23S rRNA. Furthermore, we confirmed
317 that double mutations in position 965/967 of both *rrs* alleles were associated with high MIC
318 values for oxytetracycline (> 32 µg/ml) and that double mutations at positions 748/2058 in
319 both *rrl* alleles were associated with high resistance to 16-membered macrolides (> 512
320 µg/ml). Interestingly, the resistance genotypes of isolates belonging to the ST3-lineage,
321 although few, were more varied than those of ST2 with, notably, 2 isolates showing amino
322 acid substitutions in L4 and L22 but no nucleotide substitution in position 2058 of the 23S
323 rRNA alleles. The genotypes of the two control isolates from Switzerland had also not
324 cumulated alterations in their *rrl* alleles but displayed mutations in L4 and L22 associated
325 with high MICs (Table 1). This suggests that isolates belonging to the ST3-lineage acquired
326 resistance and mutations over a different timeframe to that of the ST2 isolates.

327

328 *Comparison with isolates collected from non-respiratory diseases*

329 For comparison, 34 *M. bovis* isolates collected from non-respiratory clinical cases between
330 1982 and 2015 were also analyzed using a similar approach. These isolates originated from
331 mastitis, otitis, arthritis and a few non-documented other diseases (Supplementary Table 1).
332 They were also classified as old or recent, the recent ones having been collected after 2000.
333 MICs were estimated using the same 1 or 3 concentrations used to delineate the different
334 *M. bovis* populations from respiratory disease cases (Fig. 1), namely 8 µg/ml for
335 oxytetracycline and 1, 16 and 256 µg/ml for macrolides. Interestingly, for oxytetracycline

336 and tilmicosin the ≥ 8 and ≥ 32 (equivalent to >16) $\mu\text{g/ml}$ breakpoints, respectively,
337 correspond to those defined by the CLSI for categorization of resistant bacteria involved in
338 bovine respiratory diseases³¹. All recent isolates could be considered resistant to macrolides
339 whereas old ones (<2000) were either susceptible (7/11), intermediate (1/11) or resistant
340 (3/11) to tilmicosin. This distribution is comparable to that of isolates collected from
341 respiratory diseases. On the other hand, for all isolates, whatever their isolation dates, the
342 MIC for oxytetracycline was ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ except for 2 old isolates. The antimicrobial target
343 genes were then sequenced to detect mutations in a subset of 26 isolates representing the
344 different subtypes and MIC levels. Sequence analysis revealed the same substitution points
345 as in isolates from respiratory diseases. The distributions of gene alterations, MIC values,
346 year and isolates subtypes are shown in Fig. 4. Because no differences were evidenced
347 between isolates as a function of their clinical history (e.g. mastitis versus otitis), this
348 distinction was not introduced into the table. Three distinct groups emerged from this
349 classification: 1) ST1-isolates with minor alterations and lower MICs (although 2 were
350 already resistant to tilmicosin and 9 to oxytetracycline), 2) ST2-isolates homogeneously
351 harboring multiple hot-spot mutations and with high MICs and 3) ST3-isolates, also with
352 high MICs but which had more polymorphic *rplD*, *rplV*, *rrs* and *rrl* genes sequences. This
353 general pattern is very similar to that described for isolates from respiratory diseases in Fig.
354 3.

355

356 **Discussion**

357 Although studies to correlate antimicrobial uses in food-producing animals with the
358 emergence of drug resistance in animal bacteria started long ago, they were hampered by

359 the difficulty of gathering accurate information about antimicrobial consumption of animals
360 ^{11,36}. In contrast, monitoring the evolution of in vitro susceptibility and genetic evidence of
361 resistance over time provides a simple approach for estimating the impact of antimicrobials
362 uses on the evolution of a bacterial population in the long term. We knew from an earlier
363 study that, in France, the MICs of *M. bovis* isolates for several antimicrobials had increased ¹⁶
364 but the rapidity of this evolution and its genetic determinants had not been determined for
365 the antimicrobials targeting ribosomal RNAs.

366 Firstly our results did not evidence any difference between isolates from respiratory or other
367 bovine diseases in terms of genotypic and phenotypic resistance patterns to tetracyclines
368 and macrolides. In other words the fact that macrolides are mainly used to treat respiratory
369 diseases¹¹, unlike the broad-spectrum tetracyclines used in a range of therapeutic areas had
370 not led to a more rapid or marked resistance to macrolides in respiratory isolates. The same
371 conclusion was reached in a recent study of the MICs of *M. bovis* isolates from mastitis that
372 were compared to earlier data obtained on respiratory isolates ³⁷. This would argue in favor
373 of an efficient circulation and transmission of resistant isolates between different organs and
374 animals. In contrast, our data illustrate the potential impact of the marketing authorization
375 date, with most old isolates already being resistant to tetracyclines, released as far back as
376 the early 1950s, but not to macrolides.

377 Applying the CLSI breakpoints, 75% (20/25) of the *M. bovis* isolates collected before 2000
378 were already resistant to oxytetracycline and only one isolate was in the Susceptible
379 category (L7641). The 4 intermediate isolates ($2 < \text{MIC} < 8 \mu\text{g/ml}$) harbored a single A₉₆₇T
380 mutation in one *rrs* allele only. This 967 position is located within the primary binding pocket
381 for tetracyclines which is formed by an irregular minor groove of helix H34 (RNA residues

382 1196–1200:1053– 1056) in combination with residues 964–967 from the helix H31 stem-
383 loop¹³. It is likely that the non-mutated *rrs* copy covers the function of the mutant copy²⁰,
384 explaining why the impact of a single allele mutation on MIC values is minor. All other
385 isolates with MIC > 8µg/ml had accumulated mutations in both positions 965 and 967, and
386 systematically in both alleles for isolates collected after 2000. This suggests that homozygote
387 mutations in positions 965 and 967 of the *rrs* genes are necessary and sufficient to increase
388 the MICs of oxytetracycline and to categorize such isolates as resistant. Other observed
389 mutations may modify the accessibility of the tetracycline binding pocket but without
390 further modifying the MICs. For instance the 1058 position, located outside but next to the
391 groove of helix H34, was suggested to potentially impact the conformation of the
392 tetracycline binding pocket and was reported previously to be associated with increased
393 MICs²⁰. The G₁₀₅₈A mutation was infrequently observed in our sets of isolates (in only 6
394 isolates, mainly old ones with the exception of isolate L11480) and was not related to higher
395 MIC values. The same observation was made for the C₁₁₉₂A alteration present in all recent
396 strains (except 6, namely L15527, L11480, L11479, L15517, L15516 and F7750) in both alleles
397 but absent in old strains (except L10971). The presence/absence pattern of the T₁₁₉₉C
398 mutation (only one allele) located within H34 is very similar. The 1192 and 1199 alterations
399 were also observed in the study by Amram et al and proposed to potentially influence the
400 binding of tetracyclines²⁰. However, our opinion is that they did not influence MIC levels as
401 they were absent in the 2 Swiss isolates (that reached MICs of 64 µg/ml) but present in
402 isolates of the Amram study where the observed maximum MIC was 16 µg/ml. Other
403 secondary binding sites for tetracyclines located within the body of the 16S subunit have
404 been suggested¹³ but were either not explored here (edge of helix H11, residues 242–245)
405 or had no mutations (at least in one of the two alleles) when compared to the PG45^T control

406 isolate (major groove of helix H27, residues 891–894:908–911). In summary the A₉₆₅T and
407 A₉₆₇T mutations in both *rrs3* and *rrs4* were identified as the main cause of resistance to
408 oxytetracycline in our set of *M. bovis* isolates.

409
410 Although macrolides are mycoplasmastatic and, like tetracyclines, work by inhibiting protein
411 synthesis, they differ in their pharmacodynamic properties, including their binding site. They
412 bind within the tunnel of the 50S ribosomal subunit and interact with several key 23S rRNA
413 nucleotides, the most common one being A₂₀₅₈ (domain V), with an additional interaction of
414 tylosin-based drugs with and around nucleotide G₇₄₈ (domain II), and with the surface of
415 proteins L4 and L22^{15,38}. Tylosin was put on the market as early as 1980, while its
416 semisynthetic derivative tilmicosin was introduced later, in 1994. Interestingly the
417 susceptibility of isolates to these two molecules has evolved differently over time. Taking the
418 ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ CLSI breakpoint for tilmicosin as reference, the shift to resistance has been faster
419 for tilmicosin than for tylosin with no development of an intermediate population and
420 already highly resistant isolates amongst those collected before 2000 (9/25 for tilmicosin
421 and 3/25 for tylosin). Both chemicals share the same ribosomal binding site and although
422 their way of occupying is subtly different^{15,39}, resistance to tylosin could have co-selected
423 resistance to tilmicosin. Most recent isolates have high MIC values (≥ 128 $\mu\text{g/ml}$) and have
424 accumulated both G₇₄₈ and A₂₀₅₈ mutations in both *rrl* alleles. This result essentially confirms
425 previous observations that a combination of mutations in these hot spots of the two
426 domains is necessary and sufficient to attain high MICs^{21,38}. Interestingly, one isolate
427 collected in 1979 (no. L15818), i.e. before the two macrolides were actually used, was
428 already resistant / intermediate to tilmicosin and tylosin with MICs of 64 $\mu\text{g/ml}$ and 16
429 $\mu\text{g/ml}$, respectively. This isolate has accumulated the G₇₄₈A point mutation in both alleles of

430 the 23S rRNAs (domain II) but has no mutation in domain V or in proteins L4 and L22. How
431 this mutation was selected has yet to be determined. Furthermore, according to Novotny *et*
432 *al* a single point mutation at G₇₄₈ in *E. coli* has no appreciable effect on the MIC values of
433 tylosin and needs to be combined with a mutation at position 2058 to attain significantly
434 higher MICs³⁸. If this also holds in mycoplasmas, then we can suspect the contribution of
435 other resistance mechanisms (such as ribosomal methylation and drug efflux) in the
436 evolution of old isolates towards resistance. However this possibility must be considered
437 with caution as the L15818 isolate is the only one supporting this hypothesis. Several other
438 old isolates (L10269, L2045, L6129, L6692 and L11480 isolated in 2000 but belonging to ST1)
439 showed increased MIC values but had no mutations at all in their *rrl* genes. Their L22 protein
440 was mutated at position 93 (Q93H/K) which, despite being located far from the macrolides-
441 binding site, could influence its conformation. In contrast, the G₁₈₅R mutation in L4 alone
442 had no effect on the MICs (L1067 and F3213 with MICs $\leq 1\mu\text{g/ml}$), contrary to a previous
443 suggestion²¹. Our results further imply that L4 and L22 mutations are associated with high
444 MIC values if and only if combined with *rrl* alterations, as suggested for other mycoplasmas
445³⁴ and for *M. bovis* isolates from another country²¹. For instance four ST3 isolates, six if the
446 two isolates from Switzerland are taken into account, had MICs $\geq 64\mu\text{g/ml}$ for tylosin and
447 tilmicosin and harbored the combined alterations of G₁₈₅ (in L4) and/or Q₉₃ (in L22) and G₇₄₈A
448 (both alleles).

449

450 The shift in the *M. bovis* population from the molecular subtype ST1 (old isolates) to the
451 recent, predominant subtype ST2 was associated with a homogeneous increase of MICs and
452 a common resistant genotype (combination of the G₇₄₈A and A₂₀₅₈G alterations in the 23S
453 rRNA alleles for tylosin and that of A₉₆₅T and A₉₆₇T in the 16S rRNA alleles for

454 oxytetracycline), suggesting that the clonal spreading described earlier ¹⁷ was concomitant
455 with or had just followed the acquisition of resistance. In contrast, the timeframe of
456 evolution to resistance in the ST3 isolates, with more varied genotypes and a wider MIC
457 range, suggests that the emergence of this subtype preceded the acquisition of resistance. In
458 a previous study, ST3 isolates were shown to rapidly and efficiently gain a high level of
459 resistance to fluoroquinolones in vitro ¹⁸. This had been hypothesized to result from a
460 greater capacity to cumulate compensatory mutations that counteracted the fitness loss due
461 to antimicrobial-induced mutations. The present data confirm the better capacity of ST3
462 isolates (versus ST2) to cumulate sequence alterations (point mutations or indels) in their
463 *rrs*, *rrl*, *rplD* and *rplV* genes, both inside and outside the main binding domains (data not
464 shown). We showed here that within a very short period of time (from 2011 to 2014), ST3
465 isolates have evolved towards the same homogeneous resistance genotype as ST2, for both
466 macrolides and tetracyclines. The hypothesis of a delayed gain in resistance for the ST3-
467 lineage post emergence needs to be further confirmed by including more isolates of ST3
468 subtypes. Nonetheless, the convergence of both subtypes towards the same resistance
469 genotype suggests that the observed mutations –in brief A₉₆₅T and A₉₆₇T for tetracyclines
470 and G₇₄₈A and A₂₀₅₈G for tylosin-based drugs- have been selected and hence might provide
471 the best balance between the fitness cost of gene alterations and gain in resistance.

472

473 **Acknowledgements**

474 We thank Agnès Tricot and Adélie Colin for their excellent technical assistance, François
475 Poumarat and all the members of the VIGIMYC network for supplying several *M. bovis*
476 isolates with documented clinical histories. We are also grateful to Paola Pilo, who kindly

477 provided isolates from Switzerland. Dima Khalil's Ph.D. research was jointly funded by the
478 French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses) and the
479 Institute of Higher Education in Food Science, Animal Health, Agricultural and Environmental
480 Sciences (VetAgro Sup).

481

482

483 **Tables**

484 TABLE 1. LIST OF CLINICAL *M. BOVIS* ISOLATES FROM BOVINE RESPIRATORY DISEASE USED IN THIS STUDY, THEIR SUBTYPE, MACROLIDES AND OXYTETRACYCLINE SUSCEPTIBILITY; L4
 485 AND L22 PROTEINS AND 23S (RR1 3 & 4) AND 16S RRNA (RRS 3 & 4) POLYMORPHISM.
 486

isolates	MIC (µg/mL)			L4 ^b	23S rRNA, <i>rrf3</i> ^a		23S rRNA, <i>rrl4</i> ^a		16S rRNA, <i>rrs3</i> ^a		16S rRNA, <i>rrs4</i> ^a																											
	name	date	loc. subtype		TYL	TILM	OXT	G ₁₈₅	Q ₉₃	G ₇₄₈	G ₉₅₄	A ₂₀₅₈	G ₂₁₄₄	G ₇₄₈	G ₉₅₄	A ₂₀₅₈	C ₂₁₅₂	G ₂₅₂₆	A ₉₆₅	A ₉₆₇	G ₁₀₅₈	C ₁₁₉₂	T ₁₁₉₉	A ₉₆₅	A ₉₆₇	G ₁₀₅₈	C ₁₁₉₂	T ₁₁₉₉										
PG45	1962	USA	ST1	1	1	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/								
L15781	1978	38	ST1	1	1	64	R	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/								
L15778	1978	01	ST1	0,5	2	16	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/							
L15818	1979	14	ST1	16	64	32	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/						
L15800	1979	01	ST1	1	1	64	R	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/						
L2028	1984	43	ST1	1	2	64	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/					
L2045	1984	61	ST1	8	32	16	/	K	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/					
L2068	1985	85	ST1	1	1	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/				
L5777	1992	53	ST1	0,5	0,5	32	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/				
L6555	1993	03	ST1	64	>512	16	/	/	/	/	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/			
L7641	1994	71	ST1	0,5	0,5	2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
L7751	1994	56	ST1	4	32	16	R	H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
L8905	1995	15	ST1	128	>512	32	/	/	/	/	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
L9766	1996	41	ST1	1	1	4	R	/	/	/	/	A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
L10269	1997	50	ST1	4	32	32	/	H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
L11480	2000	35	ST1	8	128	64	/	H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
L11479	2000	12	ST2	>512	>512	32	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
L12597	2001	82	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L14057	2004	56	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L14059	2005	50	ST2	>512	>512	32	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L14075	2005	88	ST2	>512	>512	32	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L14330	2005	03	ST2	>512	>512	32	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L14611	2006	52	ST2	>512	>512	32	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L14618	2006	53	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L14753	2007	71	ST2	>512	>512	32	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

L14783	2007	53	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
L15176	2008	73	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
L15195	2009	01	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
L15508	2010	79	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
L15472	2010	56	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
L15711	2011	22	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
L15527	2011	31	ST3	512	>512	64	R	H	A	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/	/	T	T	/	/	/
L15539	2011	85	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
L15699	2011	50	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
L15762	2012	85	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
F7750	2013	85	ST3	128	512	64	R	H	A	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/	/	T	T	/	/	/
F8127	2013	65	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	C
F8428	2013	46	ST3	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	amb	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
F8065	2014	42	ST3	>512	512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
F8619	2014	44	ST3	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
F9072	2014	85	ST2	>512	>512	64	/	/	A	A	G	/	A	/	G	/	/	T	T	/	A	C	/	T	T	/	A	/
Pétunia	2010	Swi.	ST3	256	512	64	W	H	A	/	/	/	A	/	/	/	/	T	T	/	/	/	/	T	T	/	/	/
Somalia	2010	Swi.	ST3	64	512	64	/	H	A	/	/	/	A	/	/	/	/	T	T	/	/	/	/	T	T	/	/	/

487

488

489

490

491

492

493

494

495

^a *E.coli* numbering of nucleotides. The absence of mutation compared to the wild-type genotype is represented by "/"; amb., ambiguous sequence at this position with either the wildtype G or an A

^b *M. bovis* PG45^T numbering of amino acids.

Isolate numbers are preceded by a letter indicating their storage conditions: F, frozen or L, lyophilized. Old isolates are highlighted in dark grey, recent ones in light grey. Subtype was determined as previously (Becker et al. 2015); isolates for which geographic origin, clinical conditions and molecular subtypes were previously described by Becker et al 2015 are in bold; loc., location : two-digits numbers indicate the French "département" of isolation; Swi., Switzerland; TYL, Tylosin; TILM, Tilimicosin; OXT, Oxytetracycline

References

1. Waites K.B., I. Lysnyansky, and C.M. Bébéar. 2014. Emerging antimicrobial resistance in *Mycoplasmas* of humans and animals. In G.F. Browning and C. Citti (ed.). *Mollicutes - Molecular Biology and Pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 289-322.
2. Bébéar C.M., and I. Kempf. 2005. Antimicrobial Therapy and Antimicrobial Resistance. In A. Blanchard and G. Browning (ed.). *Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham, UK, pp. 535-568.
3. Pereyre S., J. Goret, and C. Bébéar. 2016. *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on macrolide resistance and treatment. *Front. Microbiol.* 7.
4. Heuvelink A., C. Reugebrink, and J. Mars. 2016. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands. *Vet. Microbiol.* 189: 1-7.
5. Nicholas R.A. 2011. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. *Vet. Rec.* 168: 459-462.
6. Maunsell F.P., A.R. Woolums, D. Francoz, R.F. Rosenbusch, D.L. Step, D.J. Wilson, and E.D. Janzen. 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 25: 772-783.
7. Mulongo M., T. Prysljak, and J. Perez-Casal. 2013. Vaccination of feedlot cattle with extracts and membrane fractions from two *Mycoplasma bovis* isolates results in strong humoral immune responses but does not protect against an experimental challenge. *Vaccine* 31: 1406-1412.
8. Soehnen M.K., A. Aydin, E.J. Lengerich, B.A. Houser, G.D. Fenton, H.R. Lyszczek, C.M. Burns, L.I. Byler, A.L. Hattel, D.R. Wolfgang, and B.M. Jayarao. 2011. Blinded, controlled field trial of two commercially available *Mycoplasma bovis* bacterin vaccines in veal calves. *Vaccine* 29: 5347-5354.
9. Burki S., J. Frey, and P. Pilo. 2015. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* 179: 15-22.
10. Apley M.D., and J.F. Coetzee. 2013. Antimicrobial Drug Use in Cattle. In S. Giguère, J.F. Prescott, and P.M. Dowling (ed.). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Fifth Edition ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ., pp. 495-518.
11. De Briyne N., J. Atkinson, L. Pokludova, and S.P. Borriello. 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet. Rec.* 175: 325.
12. del Castillo J.R.E. 2013. Tetracyclines. In S. Giguère, J.F. Prescott, and P.M. Dowling (ed.). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Fifth Edition ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ., pp. 257-268.
13. Brodersen D.E., W.M. Clemons, Jr., A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, and V. Ramakrishnan. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 103: 1143-1154.
14. Giguère S. 2013. Macrolides, Azalides, and Ketolides. In S. Giguère, J.F. Prescott, and P.M. Dowling (ed.). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Fifth Edition ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ., pp. 211-231.
15. Poehlsgaard J., N.M. Andersen, R. Warrass, and S. Douthwaite. 2012. Visualizing the 16-membered ring macrolides tildipirosin and tilmicosin bound to their ribosomal site. *ACS Chem. Biol.* 7: 1351-1355.
16. Gautier-Bouchardon A.V., S. Ferre, D. Le Grand, A. Paoli, E. Gay, and F. Poumarat. 2014. Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PloS one* 9: e87672.
17. Becker C.A., F.M. Thibault, M.A. Arcangioli, and F. Tardy. 2015. Loss of diversity within *Mycoplasma bovis* isolates collected in France from bovines with respiratory diseases over the last 35 years. *Infect., Genet. Evol.* 33: 118-126.

18. Khalil D., C.A. Becker, and F. Tardy. 2016. Alterations in the Quinolone Resistance-Determining Regions and Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates and Laboratory-Derived Mutants of *Mycoplasma bovis*: Not All Genotypes May Be Equal. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 1060-1068.
19. Gerchman I., S. Levisohn, I. Mikula, and I. Lysnyansky. 2009. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle. *Vet. Microbiol.* 137: 268-275.
20. Amram E., I. Mikula, C. Schnee, R.D. Ayling, R.A. Nicholas, R.S. Rosales, S. Harrus, and I. Lysnyansky. 2015. 16S rRNA gene mutations associated with decreased susceptibility to tetracycline in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 796-802.
21. Lerner U., E. Amram, R.D. Ayling, I. Mikula, I. Gerchman, S. Harrus, D. Teff, D. Yogev, and I. Lysnyansky. 2014. Acquired resistance to the 16-membered macrolides tylosin and tilmicosin by *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* 168: 365-371.
22. Kong L.C., D. Gao, B.Y. Jia, Z. Wang, Y.H. Gao, Z.H. Pei, S.M. Liu, J.Q. Xin, and H.X. Ma. 2015. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma bovis* isolates from multiple provinces in China. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 293-296.
23. Degrange S., H. Renaudin, A. Charron, S. Pereyre, C. Bebear, and C.M. Bebear. 2008. Reduced susceptibility to tetracyclines is associated in vitro with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 1390-1392.
24. Lovmar M., K. Nilsson, E. Lukk, V. Vimberg, T. Tenson, and M. Ehrenberg. 2009. Erythromycin resistance by L4/L22 mutations and resistance masking by drug efflux pump deficiency. *EMBO J* 28: 736-744.
25. Chazel M., F. Tardy, D. Le Grand, D. Calavas, and F. Poumarat. 2010. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet. Res.* 6: 32.
26. Aebi M., M. Bodmer, J. Frey, and P. Pilo. 2012. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Vet. Microbiol.* 157: 363-368.
27. Poumarat F., D. Longchambon, and J.L. Martel. 1992. Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within "*M. mycoides* cluster" and within "glucose and arginine-negative cluster" of ruminant mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* 32: 375-390.
28. Poumarat F., B. Perrin, and D. Longchambon. 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.* 29: 329-338.
29. Marena M.S., E. Sagne, F. Poumarat, and C. Citti. 2005. Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiology* 151: 475-489.
30. Hannan P.C. 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *International Research Programme on Comparative Mycoplasmology. Vet. Res.* 31: 373-395.
31. CLSI. 2013. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Fourth Edition*. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
32. Lysnyansky I., and R.D. Ayling. 2016. *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility. *Front. Microbiol.* 7.
33. Matsuoka M., M. Narita, N. Okazaki, H. Ohya, T. Yamazaki, K. Ouchi, I. Suzuki, T. Andoh, T. Kenri, Y. Sasaki, A. Horino, M. Shintani, Y. Arakawa, and T. Sasaki. 2004. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 4624-4630.
34. Pereyre S., P. Gonzalez, B. De Barbeyrac, A. Darnige, H. Renaudin, A. Charron, S. Raherison, C. Bebear, and C.M. Bebear. 2002. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to

- macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3142-3150.
35. Schlunzen F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, and F. Franceschi. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413: 814-821.
 36. Chantziaras I., F. Boyen, B. Callens, and J. Dewulf. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 69: 827-834.
 37. Barberio A., B. Flaminio, S. De Vliegher, K. Supre, V. Kromker, C. Garbarino, N. Arrigoni, G. Zanardi, L. Bertocchi, F. Gobbo, S. Catania, and P. Moroni. 2016. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates identified in milk from dairy cattle in Belgium, Germany, and Italy. *J. Dairy Sci.* 99: 6578-6584. .
 38. Novotny G.W., L. Jakobsen, N.M. Andersen, J. Poehlsgaard, and S. Douthwaite. 2004. Ketolide antimicrobial activity persists after disruption of interactions with domain II of 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3677-3683.
 39. Andersen N.M., J. Poehlsgaard, R. Warrass, and S. Douthwaite. 2012. Inhibition of protein synthesis on the ribosome by tildipirosin compared with other veterinary macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 6033-6036.

Figures

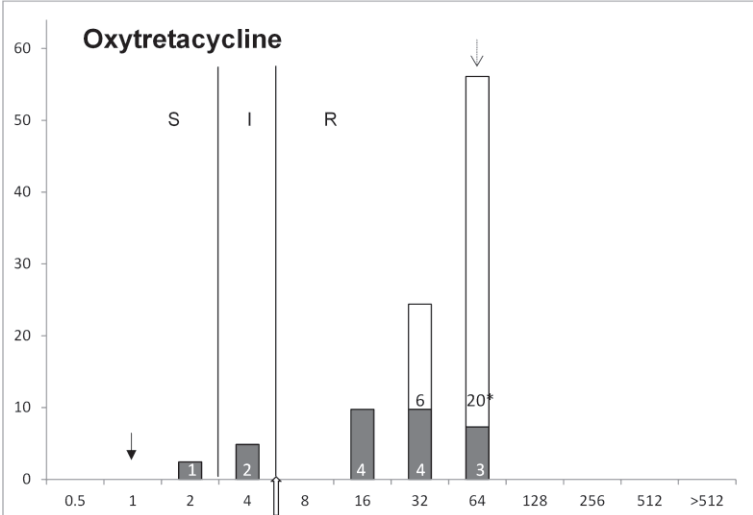
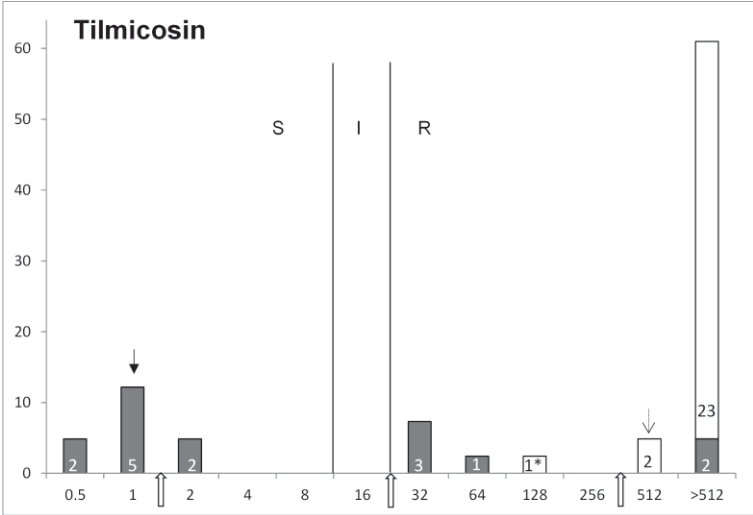
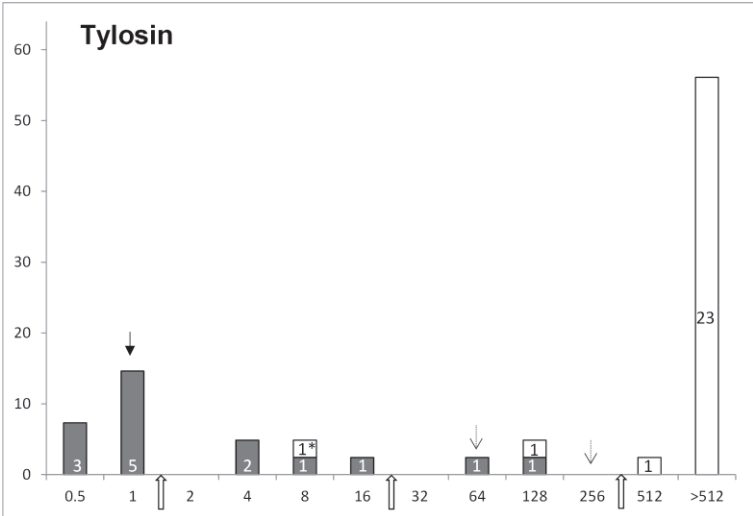


FIG. 1. COMPARISON OF MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATIONS (MICs) DISTRIBUTIONS OF 3 ANTIMICROBIALS FOR 40 *MYCOPLASMA BOVIS* ISOLATES COLLECTED FROM BOVINE RESPIRATORY DISEASES IN FRANCE BETWEEN 1978 AND 2014

Old isolates (1978-1997, n=14) and recent ones (2000-2014, n=26) are represented by grey and white bars, respectively. The number of isolates per MIC data is indicated in the bars.

X-axis, MICs in $\mu\text{g/ml}$; Y-axis, % of isolates.

Black and open arrows indicate MICs for PG45^T and Swiss strains, respectively. Double arrows below the X-axis indicate the epidemiological cut-off for each antimicrobial. The asterisk indicates the position of the isolate collected in year 2000 but belonging to subtype1 (no. L11480). The S, I and R sections correspond to isolates categorized as Susceptible, Intermediate or Resistant using the CLSI breakpoints (when available) for other bacteria responsible for respiratory diseases in cattle.

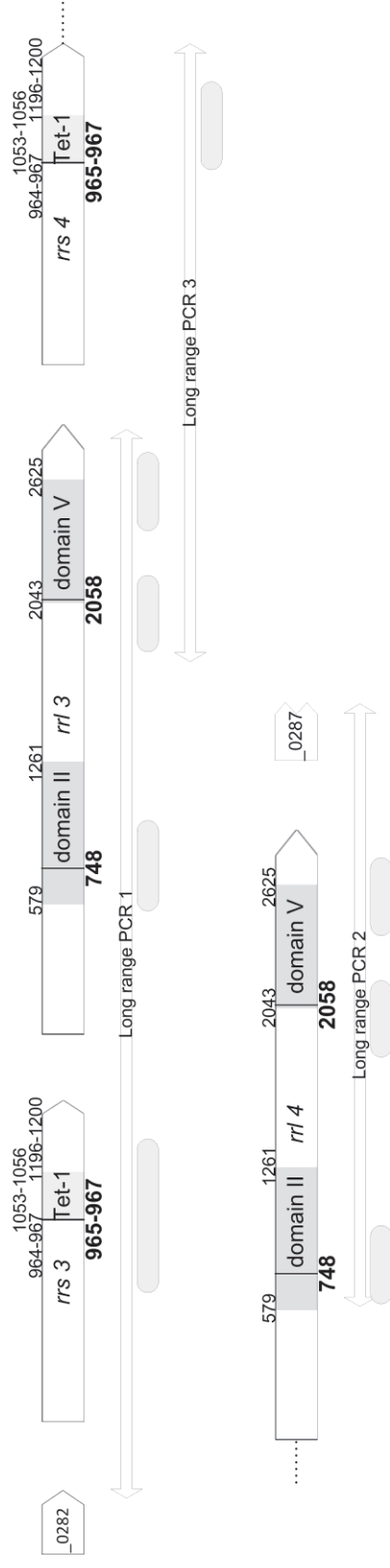


FIG. 2. GRAPHICAL REPRESENTATION OF THE *RRS* AND *RRL* GENES REGIONS OF *M. BOVIS*

Genes are represented by arrows and named after their locus tag in PG45^T. Grey squares highlight the binding domains of both tetracyclines (*rrs*) and macrolides (*rrl*) and mutations hot spots are indicated by black lines. The long-range PCR assays used in the study are positioned by double arrows. Curved edge boxes indicate the sequences that were analyzed (for exact position see Supp. Table 2).

Supplementary Table 1: List of clinical *M. bovis* isolates collected from non-respiratory disease used in this study, their subtype, macrolides and oxytetracycline susceptibility; L4 and L22 proteins and 23S (*rrl 3 & 4*) and 16S rRNA (*rrs 3 & 4*) polymorphism.

isolates		MIC ($\mu\text{g/mL}$)		L4 ^b L22 ^b		23S rRNA, <i>rrl 3</i> ^a		23S rRNA, <i>rrl 4</i> ^a		16S rRNA, <i>rrs 3</i> ^a		16S rRNA, <i>rrs 4</i> ^a												
name	date	loc.	clinical signs	subtype	TYL	TILM	OXT	G ₁₈₅	Q ₉₃	G ₇₄₈	G ₉₅₄	A ₂₀₅₈	G ₇₄₈	G ₉₅₄	A ₂₀₅₈	G ₇₄₈	G ₉₅₄	A ₂₀₅₈	A ₉₆₅	A ₉₆₇	G ₁₀₅₈	C ₁₁₉₂	T ₁₁₉₉	
F2984	≤1982	nk	Mastitis	ST1	≤1	≤1	>8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/
L1067	1983	56	Mastitis	ST1	≤1	≤1	≤8	R	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
F3213	1990	15	Mastitis	ST1	≤1	≤1	>8	R	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/
L2048	1986	50	nk	ST1	≤1	≤1	>8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/
L4785	1990	14	nk	ST1	≤16	≤16	>8	/	/	A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/
L6129	1992	03	nk	ST1	≤16	≤256	>8	R	H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/
L6692	≤1993	53	Mastitis	ST1	≤16	≤256	>8	R	H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	A	/	/
F3697	1994	68	Arthritis	ST1	≤1	≤1	>8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/
L7763	1994	71	Arthritis	ST1	≤1	≤1	≤8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
L7897	1994	68	Arthritis	ST1	≤1	≤1	>8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/
L10971	1999	53	nk	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
F10417	2007	87	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
L15174	2008	01	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
L15305	2009	44	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
L15228	2009	35	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L15279	2009	44	Arthritis	ST2	>256	>256	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L15207	2009	50	Otitis	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
L15203	2009	01	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L15230	2009	44	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L15491	2010	61	Arthritis	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
L15691	2011	85	Arthritis	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
L15968	2011	54	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
L15517	2011	48	Otitis	ST3	≤256	>256	>8	R	H	A	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/	/
L15516	2011	31	Otitis	ST3	≤256	>256	>8	R	H	A	/	/	/	/	/	/	/	/	T	T	/	/	/	/
L15756	2012	61	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	/	/	A	A	G	/	/	/	/	/	/	T	T	/	A	/	/
L15847	2012	53	Arthritis	ST2	>256	>256	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

L16051	2013	50	Otitis	ST2	>256	>256	>8	/	A	A	G	A	/	G	T	T	/	A	C	T	T	/	A	/
L16055	2013	44	Arthritis	ST2	>256	>256	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L16072	2013	31	Arthritis	ST2	>256	>256	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L16053	2013	53	Arthritis	ST3	>256	>256	>8	/	A	A	G	A	/	G	T	T	/	A	C	T	T	/	A	/
F9059	2014	79	Arthritis	ST2	>256	>256	>8	/	A	A	G	A	/	G	T	T	/	A	C	T	T	/	A	C
F9019	2014	61	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F9037	2014	50	Mastitis	ST3	>256	>256	>8	/	A	A	G	A	/	G	T	T	/	A	C	T	T	/	A	/
F9927	2015	62	Mastitis	ST2	>256	>256	>8	/	A	A	G	A	/	G	T	T	/	A	C	T	T	/	A	C

^a *E. coli* numbering of nucleotides, the absence of mutation compared to the wild-type genotype are represented by "/". nd, sequence analysis was "not done"

^b *M. bovis* PG45^T numbering of amino acids

Isolate numbers are preceded by a letter indicating their storage conditions: F, frozen and L, lyophilized. Old isolates are highlighted in dark grey, recent ones in light grey.

Subtype was determined as previously (Becker et al. 2015); isolates for which geographic origin, clinical conditions and molecular subtypes were previously described by

Becker et al 2015 are in bold; loc., location : two-digits numbers indicate the French "département" of isolation; nk, not known

MICs were determined using only three concentrations (1, 16, 256 µg/mL) for macrolides (TYL, tylosin; TILM, Tilmicosin) and one for oxytetracycline (OXT, 8 µg/mL). Hence

≤ 16 refers to isolates with 1 < MICs ≤ 16 µg/mL and ≤ 256 to isolates with 16 < MICs ≤ 256 µg/mL

Supplementary table 2: Primers and PCR conditions used in this study

PCR type	no. ^a	target	Primers		PCR assay				PCR product size (bp)	Sequence analyzed ^c	Reference
			name	Sequence 5'-3'	denaturation	amplification cycles	elongation	condi- tions ^b			
Long range	1	<i>rrl3</i>	MB-282-F	GGATATCTAACGCCGTGTCT	98°C for 30"	40 cycles	72°C for 3'	I	5041	Lerner et al 2013	
			MB-rrl-3R	GTA CTGGTCAGCTCAACAC	98°C for 30"	98° for 5", 56°C for 5" and 72°C for 2'	72°C for 3'	I	5041		
	2	<i>rrl4</i>	MB-rrl-IIF MB-287-R	GCATGCAAGGTTAAGCAG CTAATTCCAAGTGCCACTAGCG	98°C for 30"	40 cycles	72°C for 3'	I	2848	Lerner et al 2013	
3	<i>rrs4</i>	23S-V1-F	TGAGGGGCAACTGTTTATCAAAA	98°C for 30'	35 cycles	72°C for 10'	I	2922	This study Johansson et al. 1998		
		U8	GAAAGGAGGTRWTCAYCCSCAC	98°C for 30'	98°C for 10", 55°C for 30" and 72°C for 3'	72°C for 10'	I	2922			
1,3	<i>rrs-3/4</i>	U1	GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAACG	94°C for 4'	35 cycles	72°C for 10'	II	1505	Johansson et al. 1998		
		U8	GAAAGGAGGTRWTCAYCCSCAC	94°C for 4'	96°C for 15", 70°C for 2'	72°C for 10'	II	1505			
Nested	1	<i>rrl3 Domain II</i>	23S-II-F	ACAATTAGACAGAGCCCGTTAAT	95°C for 3'	30 cycles	72°C for 10'	III	497	This study	
			23S-II-R	ACTTAACACGATTTTGGGACCTT	95°C for 3'	95°C for 30", 56°C for 30" and 72°C for 45"	72°C for 10'	III	497		
2	<i>rrl4 Domain II</i>	MB-rrl-IIF	GCATGCAAGGTTAAGCAG	95°C for 3'	30 cycles	72°C for 10'	III	429	This study Lerner et al 2013		
		23S-II-R	ACTTAACACGATTTTGGGACCTT	95°C for 3'	95°C for 30", 56°C for 30" and 72°C for 45"	72°C for 10'	III	429			

1:2	<i>rrl 3/4 Domain V1</i>	23S-V1-F	TGAGGGGCAACTGTTTATCAAAA	95°C for 3'	30 cycles 95°C for 30", 56°C for 30" and 72°C for 45"	72°C for 10'	III	421	1812-2172	This study
		23S-V1-R	AACAAGGGTGGTATTTC AAGGTT							
1:2	<i>rrl 3 /4 Domain V2</i>	23S-V2-F	TGACTGTGAGACATACAAGT	95°C for 3'	30 cycles 95°C for 30", 52°C for 30" and 72°C for 45"	72°C for 10'	III	422	2384-2753 2386-2753	This study
		23S-V2-R	TTCCCACTTAGATGCTTTCA							
Usual	<i>rpID</i>	L4-F	AAGCGCAAAAACTACAACAA	95°C for 3'	40 cycles 95°C for 30", 54°C for 30" and 72°C for 45"	72°C for 3'	III	737	272-956 (91-316)	This study
		L4-R	TCCCTTCAAAGTTTTTCATAGC							
Usual	<i>rpIV</i>	MB-L22-F	ATGAGTCTCAACAAGCTA	98°C for 30"	40 cycles 98°C for 5", 54°C for 5" and 72°C for 30"	72°C for 3'	III	345	57-336 (19-112)	Lerner et al 2013
		MB-L22-R	TTACGCCCTTCTTCCAATGC							

^a no. refers to the number of the long range PCR used as a template for nested ones

^b PCR assay conditions: I, PCR volume: 50µl & Fusion Taq (NEB); II, PCR volume: 50µl & Go Taq (Promega); III, PCR volume: 25µl & Go Taq (Promega)

^c positions delineating the analysed sequence, *E. coli* numbering, except L4 & L22 *M. bovis* numbering with aa positions indicated into brackets.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion générale et perspectives

En raison de l'utilisation massive et parfois non raisonnée des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, les bactéries pathogènes ont pu développer des mécanismes de résistance contre la plupart des familles d'antibiotiques utilisées actuellement. *M. bovis* n'est pas une exception à cette règle (1, 60-63, 84, 98, 119, 120, 124, 130, 131).

En médecine vétérinaire, l'utilisation des antibiotiques vise trois objectifs différents : 1) le traitement individuel des animaux malades, 2) le traitement collectif pour prévenir la propagation de la maladie dans un élevage ou 3) l'amélioration des performances zootechniques (promoteurs de croissance). Cette dernière utilisation a été interdite récemment dans la plupart des pays (Janvier 2006). Pour les traitements collectifs ou individuels, on n'a pas forcément recours aux mêmes molécules. En prévention, des antibiotiques à spectre large sont souvent utilisés alors que des molécules à spectre étroit sont privilégiées en traitement individuel après identification de la bactérie responsable de l'affection.

L'utilisation de plusieurs familles d'antibiotiques en cas de BPIE est souvent nécessaire pour éliminer les différents agents étiologiques potentiellement impliqués (65). Par exemple, l'utilisation des β -lactamines va éliminer les pasteurelles mais favoriser l'implantation durable des mycoplasmes puisque ceux-ci, sans paroi, sont naturellement résistants à cette classe de molécules. Or, en l'absence de vaccins efficaces (132, 133), le contrôle de *M. bovis* repose quasi exclusivement sur des traitements antibiotiques. Certains macrolides ont une indication spécifique pour les mycoplasmoses à *M. bovis* (111). Les tétracyclines sont également utilisées comme traitement de première intention des BPIE, en raison de leur faible coût, leur facilité d'administration et leur large spectre d'action (134). Ces deux familles d'antibiotiques sont utilisées contre les mycoplasmoses en général à titre curatif et préventif. En revanche, les fluoroquinolones sont prescrites uniquement pour le traitement individuel des mycoplasmoses (82), elles ont de plus été mises sur le marché plus récemment (1991 pour l'enrofloxacin, 1996 pour la danofloxacin et 1997 pour la marbofloxacin). Cet usage plus restreint et plus récent des fluoroquinolones pourrait expliquer la perte de sensibilité mineure observée pour cette famille d'antibiotiques par opposition à l'augmentation importante des CMI des macrolides et tétracyclines chez *M. bovis* (81, 82).

La recherche des mécanismes moléculaires sous-tendant la résistance de *M. bovis* aux antibiotiques chez les bovins a constitué l'objectif principal de cette étude. La caractérisation des isolats de l'étude a confirmé, deux phénomènes préalablement observés :

- la perte de sensibilité des isolats récents (1) et
- la circulation, aujourd'hui, d'un sous-type majoritaire (95).

Les isolats de *M. bovis* inclus dans cette étude ont été choisis selon 3 critères :

- des isolats plus récents que ceux étudiés précédemment, c'est-à-dire collectés au-delà de 2012 et ce afin de poursuivre la surveillance des sous-types circulant et des profils d'antibiosensibilité ;
- des isolats collectés durant la période intermédiaire entre 1979 et 2009 et ce afin de déterminer comment et à quelle moment l'émergence de la résistance aux macrolides et aux tétracyclines s'est produite
- et enfin, des isolats issus de maladies autres que les pneumonies, comme par exemple, des mammites, arthrites et otites, afin de rechercher un éventuel effet différentiel des pratiques thérapeutiques liées au type de pathologie sur l'évolution de la résistance (77).

Distribution des CMI pour les macrolides, les tétracyclines et les fluoroquinolones

Les résultats de Gautier-Bouchardon *et al.* avaient montré que la population contemporaine de *M. bovis* (isolats collectés entre 2009 et 2012) était à 100% résistante aux macrolides et tétracyclines par rapport à l'ancienne population (isolats collectés entre 1978 et 1979) relativement sensible à quelques exceptions près (1). Notre étude a globalement confirmé ces résultats et a de plus permis d'explorer de nouvelles périodes de collecte (en continu entre 1978 et 2014). Nous avons montré que dès l'année 2000 les isolats de *M. bovis* présentent des CMI très élevées pour les tétracyclines (64 µg/mL) et les macrolides (≥ 256 µg/mL). En l'absence de valeurs cliniques seuils définies pour les mycoplasmes, nous avons eu recours pour catégoriser notre population d'isolats aux seuils des *Pasteurellaceae*, à savoir 8 µg/mL pour l'oxytétracycline et ≥ 32 µg/mL pour la tilmicosine et par extension pour la tylosine selon le CLSI (1). Ceci nous permet d'affirmer que la résistance aux tétracyclines

préexistait chez d'anciens isolats de *M. bovis* dès 1978 puisque 20 isolats parmi les 25 isolés avant l'année 2000 avaient une CMI > 8 µg/mL. Ce résultat est loin d'être surprenant étant donné que l'oxytétracycline fait partie des premiers antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et a été introduite sur le marché dès les années 50. Pour les macrolides, l'évolution vers la résistance est plus récente puisque la majorité des souches anciennes (1978-2000) étaient sensibles à la tylosine et à la tilmicosine avec seulement 6 isolats sur 25 pouvant être classés comme résistants. Ces deux macrolides ont été introduits sur le marché plus tardivement que l'oxytétracycline, en 1982 pour la tylosine et en 1994 pour la tilmicosine. Par contre, 100% des isolats récents (isolés après 2000) ont des CMI très élevées pour ces deux familles d'antibiotiques (≥ 32 µg/mL pour l'oxytétracycline et ≥ 256 µg/mL pour les deux macrolides). Donc, nos résultats confirment l'existence d'une résistance massive aux macrolides et aux tétracyclines chez les souches récentes et permettent d'en faire remonter l'émergence aux années 1978 pour les tétracyclines et 2000 pour les macrolides. Par ailleurs, les distributions des CMI pour des isolats issus de maladies non-respiratoires se sont avérées très similaires à celles observées pour les souches de *M. bovis* issues de BPIE. Cela montre que les pratiques thérapeutiques différenciées en fonction de la pathologie n'ont pas eu d'effet sur la sélection de la résistance. Ce résultat suggère également que ce sont les mêmes souches qui circulent dans les différents tissus et chez les différents animaux.

En ce qui concerne les fluoroquinolones, nos résultats montrent, comme ceux de Gautier-Bouchardon et *al.* (1), un léger déplacement des valeurs de CMI des isolats récents par rapport aux anciens. La CMI₅₀ augmente de 0,25 à 0,5 µg/mL. Cette situation peut être considérée comme encore favorable puisque d'après les seuils critiques pour l'enrofloxacin ($0,25 < \text{CMI} < 2$ µg/mL pour les souches intermédiaires et $\text{CMI} > 2$ µg/mL pour les souches résistantes selon le CLSI chez les *Pasteurellaceae* (39). Les souches françaises sont donc passées de sensibles à intermédiaires mais avec une augmentation très modérée des CMI. Cependant, notre criblage a mis en évidence dès 2013, un premier isolat clinique avec une CMI égale à 16 µg/mL, considéré donc comme résistant. On est en droit de se poser la question si l'on observe là les frémissements d'un début d'émergence de la résistance aux fluoroquinolones. Cependant une étude préliminaire en cours sur des isolats collectés entre 2014 et 2016, n'a permis d'identifier qu'un seul isolat résistant qui date de 2014 (CMI = 16 µg/mL). Ce criblage reste à valider sur un échantillonnage plus large mais l'identification de seulement deux isolats résistants suggère que l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones n'est pas massive. Il est à noter que les fluoroquinolones de troisième

génération, c'est-à-dire l'enrofloxacin, la danofloxacin et la marbofloxacin ont été mises sur la liste des molécules critiques en thérapie vétérinaire en mars 2016 (Code de la santé publique - Article R5141-117-2, Décret n°2016-317 du 16 mars 2016 - art. 2). Du fait de ces nouvelles précautions d'usage et de l'apparition sporadique d'isolats cliniques résistants observée jusqu'à présent, la sélection des souches résistantes aux fluoroquinolones devrait rester limitée. Cette perspective positive est un élément de motivation supplémentaire pour la surveillance de l'antibiosensibilité de *M. bovis* en France. En ce qui concerne les macrolides et les tétracyclines, malgré le constat d'une résistance chez 100% des isolats récents il semble également impératif de continuer à surveiller les profils d'antibiosensibilité.

La surveillance en continu de la résistance chez *M. bovis* nécessitera, et c'est une perspective importante de cette thèse, la simplification de la méthode de détermination de CMI au laboratoire. La réalisation des CMI pour les mycoplasmes est en effet une méthode lourde et longue à mettre en place. Elle demande, préalablement à l'expérience, la préparation d'une gamme complète des concentrations d'antibiotiques et d'inocula calibrés des cultures. Pour mémoire, le calibrage d'inocula de cultures mycoplasmiques est d'autant plus compliqué que le pléomorphisme des cellules interdit l'usage de la spectrophotométrie classique (mesure de la DO₆₀₀), et le temps de croissance assez long (3 à 5 jours pour *M. bovis*). Une méthode simplifiée consisterait à réaliser des mesures de croissance sur gélose, non pas avec une gamme complète de concentrations antibiotiques mais avec quelques concentrations correspondant aux seuils épidémiologiques observés dans la présente étude. D'après les résultats du second article, un milieu gélosé contenant 8 µg/mL d'oxytétracycline est suffisant pour discriminer les isolats sensibles (< 8 µg/mL) et les isolats résistants (≥ 8 µg/mL). De même, 3 valeurs épidémiologiques critiques pour la tylosine et la tilmicosine pourront être utilisées pour classer les isolats en tant que sensibles (<16 µg/mL), intermédiaires (32 ≤ CMI ≤ 64) et résistants (≥ 128 µg/mL). Pour les fluoroquinolones, les isolats qui auraient des CMI supérieures à 2 µg/mL pourraient être considérés comme résistants. En théorie, avec l'application de la nouvelle réglementation en matière d'usage antibiotique, un antibiogramme « rapide » pour les fluoroquinolones serait à réaliser absolument pour justifier la prescription du traitement, en cas d'identification de *M. bovis*.

Emergence passée d'un clone multi-résistant aux macrolides et aux tétracyclines

La recherche des mécanismes moléculaires sous-tendant la résistance observée était l'objectif principal de cette thèse. Dans la littérature, la modification de la cible est le mécanisme le plus couramment décrit chez les mycoplasmes animaux et le seul mécanisme décrit jusqu'à présent chez les isolats résistants aux macrolides et aux tétracyclines de *M. bovis* dans le monde (62, 107, 119, 120). Par conséquent, le séquençage des gènes cibles de ces antibiotiques, les ARNr 16S pour les tétracyclines et les ARNr 23S et les protéines ribosomales L4 et L22 pour les macrolides, a été réalisé pour l'ensemble des isolats. Après comparaison des séquences avec la souche de référence PG45^T, des mutations ponctuelles dans les sites d'interaction des différentes molécules ont été retrouvées. Sur les souches récentes, nous avons démontré que l'accumulation de mutations aux positions 965/967 dans les deux allèles de l'ARNr 16S et aux positions 784 et 2058 dans les deux copies de l'ARNr 23S étaient associées avec des CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ pour l'oxytétracycline et ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ pour la tylosine et la tilmicosine, respectivement. Ce génotype majoritaire, A₉₆₅T/A₉₆₇T dans l'ARNr 16S et G₇₄₈A/A₂₀₅₈G dans l'ARNr 23S, expliquait les hautes valeurs de CMI associées, et par conséquent le phénotype multi-résistant. D'autres points de mutations ont été identifiés à plusieurs positions, pas forcément dans le site d'interaction entre la molécule d'antibiotique et la cible. C'est le cas par exemple de la position 1058 observée dans les deux copies de l'ARNr 16S. Pour nos isolats, cette mutation G₁₀₅₈A, la plupart du temps cumulée avec les mutations 965/967, n'a pas été associée à une hausse supplémentaire des CMI de l'oxytétracycline, contrairement à ce qui avait été suggéré par une autre étude (107). Dans l'ARNr 23S, une mutation en position 954 (G₉₅₄A), située en dehors du site d'interaction de l'antibiotique avec sa cible, a été retrouvée chez un grand nombre de souches (25 des 26 souches isolées après 2000) mais n'a pas été associée à une hausse de CMI des macrolides. Cette mutation n'a jamais été décrite dans la littérature précédemment. Pour les souches anciennes, les génotypes des gènes cibles, c'est-à-dire l'ARNr 16S et 23S, étaient beaucoup plus diversifiées, donnant une gamme assez large de CMI variant 16 et ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ pour les macrolides et 2 et 32 $\mu\text{g/mL}$ pour les tétracyclines.

Nous avons également cherché à mettre en lien les différents sous-types moléculaires décrits précédemment (95), les profils d'antibiosensibilité et les mécanismes moléculaires. L'idée était de retracer l'historique de l'émergence de la résistance et les génotypes associés par rapport à l'émergence des différents sous-types moléculaires. Par analyse du

polymorphisme du gène codant la polymérase C (*polC*), selon la méthodologie proposée précédemment (95), l'ensemble des isolats de notre échantillon d'étude était réparti comme suit : 31 isolats appartenant au ST1 et tous isolés avant 2000, 1 souche ST1 isolée en 2000, 67 isolats appartenant au ST2 isolés après 2000 et 9 isolats plus récents (2010-2014) appartenant au ST3. Cette distribution est tout à fait cohérente avec celle proposée par Becker et al. (95) qui a daté l'émergence du ST2 vers les années 2000, quoique faisant apparaître une proportion plus importante de ST3.

Si on regarde les résultats dans leur globalité, le ST2 regroupe des isolats récents (> 2000), ayant de fortes CMI pour les macrolides et tétracyclines (≥ 256 et ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ respectivement) et ayant cumulé de façon très homogène les mêmes points de mutation conférant la résistance, c'est-à-dire les positions 965/967 et 748/2058 dans les deux copies des ARNr 16S et ARNr 23S respectivement. Ce génotype majoritaire semble procurer aux isolats ST2 le meilleur équilibre entre les avantages du phénotype résistant et le coût physiologique (« fitness ») de ces mutations. De plus, chez ces mêmes souches, des mutations aux positions 954 et 1199 dans une seule copie des ARNr 23S et 16S ont aussi été détectées. Une autre mutation dans les deux copies de l'ARNr 16S a été détectée à la position 1192 (C₁₁₉₂A). Ces mutations ont été caractérisées exclusivement chez les souches isolées après 2000 (tous les isolats ST2 et quelques ST3).

Par contraste, le ST1 regroupe des souches anciennes (< 2000) avec différents profils de sensibilité aux macrolides et tétracyclines et différents génotypes associés. Les souches collectées sporadiquement (6 isolats) entre 1978 et 2000 avaient quelques mutations dans les hot-spots, leur conférant une hausse de CMI des macrolides ($16 \rightarrow \geq 256$ $\mu\text{g/mL}$). La mise sur le marché de la tylosine (1980) et la tilmicosine (1994) pourrait expliquer la sélection des isolats résistants. La sélection définitive du génotype résistant a eu lieu à partir de 2000 avec 100% des souches isolées résistantes, possédant toutes les mutations hot-spots. Cette sélection coïncide avec l'émergence du ST2.

Enfin, les premières souches ST3 isolées en 2011 avaient moins de mutations dans les gènes cibles des macrolides et des tétracyclines tout en montrant de hautes valeurs de CMI. Ce même profil a été retrouvé chez deux isolats Suisses ST3, inclus dans cette étude comme témoins externes. Les autres souches de ce sous-type isolées plus tard, ont évolué vers le même génotype que celui du ST2 en moins de deux ans. Cette évolution vers le même génotype (A₉₆₅T/A₉₆₇T dans l'ARNr 16S et G₇₄₈A/A₂₀₅₈G dans l'ARNr 23S) pour les deux

sous-types (ST2 et ST3) montre que ce génotype, comme dans les cas des ST2, a conféré aux différents isolats la juste balance entre coût physiologique (« fitness ») et bénéfice du phénotype multi-résistant.

Emergence future de la résistance pour les fluoroquinolones ?

Pour les fluoroquinolones, des mutations dans les QRDR, régions des gènes codant l'ADN gyrase et la topoisomérase (*gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*), ont été associées à des hausses de CMI chez des isolats de *M. bovis* dans d'autres pays (124, 129). Ce présent travail a montré que les souches françaises anciennes (CMI₅₀ à 0,25 µg/mL) ont le même génotype que PG45^T, la souche de référence sauvage et appartiennent au ST1. Toutes les souches récentes (CMI₅₀ à 0,5 µg/mL) possédaient une mutation dans GyrB, et appartenaient majoritairement au ST2 à l'exception de quatre isolats (ST3). Deux mutations supplémentaires ont été retrouvées chez 3 souches récentes (ST2) dans ParC (position 80 et 83) mais ne sont pas associées à une augmentation des valeurs de CMI par rapport aux autres souches récentes n'ayant pas ces substitutions. Seul l'isolat clinique résistant, la souche #8428, avait cumulé deux mutations dans GyrA et ParC. Il appartient de plus au troisième sous-type, peu abondant, le ST3 (135).

Nos expériences de sélection *in vitro* en présence d'enrofloxacin, réalisées sur des isolats des 3 sous-types, ont permis de sélectionner des mutants essentiellement à partir des isolats ST3. Les mutations sélectionnées *in vitro* déjà décrites dans la littérature comme « hot-spots », les positions 81/83 dans GyrA et 80/84 dans ParC, conférant la résistance, ont été associées à des hausses importantes des CMI. Par contraste, les isolats appartenant aux ST1 et le ST2 ont eu plus de difficultés à survivre sous pression de l'antibiotique. Seulement quelques mutants issus de ces deux sous-types ont été sélectionnés lors de ces expériences. Ces mutants n'avaient pas le même niveau de résistance que les mutants ST3 (CMI de l'enrofloxacin 4-16 µg/mL pour ST1 et 2-4 µg/mL pour ST2 versus 16-32 µg/mL pour ST3) et pas les mêmes mutations non plus. Par exemple, les mutants ST2 n'ont pas réussi tout le long des étapes de sélection à cumuler des mutations simultanément dans GyrA et ParC, génotype associé à la hausse des CMI. Nos résultats *in vitro* suggèrent que les isolats appartenant au ST3 seraient plus aptes à accumuler les mutations conduisant à la résistance. Ces isolats représentaient 2.5 % des souches récentes en 2012 et nous avons montré que leur

proportion est passée à 20 % en 2014. Une autre étude préliminaire réalisée au sein du laboratoire dans le cadre d'un stage d'IUT en 2016 montre que la proportion de ce sous-type semble rester stable avec 15 % en 2015 et 26% en 2016. Par contre, le deuxième isolat résistant aux fluoroquinolones isolé en 2014 avec une CMI de 16 µg/mL a été démontré comme appartenant au ST3, suggérant là encore que l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones serait plus à redouter chez ce sous-type. Le suivi de l'évolution des différents sous-types circulant actuellement en France doit être poursuivi sur un grand nombre d'isolats afin de confirmer le lien entre résistance aux fluoroquinolones et appartenance au ST3. De façon très intrigante, parmi les souches isolées en 2015 et étudiées dernièrement, une semble appartenir au ST1, considéré comme le sous-type ancien ayant précédé l'émergence du ST2 en 2000. La caractérisation phénotypique et génotypique de cette souche sera nécessaire pour comprendre si elle possède toutes les caractéristiques des anciens isolats français ST1, c'est-à-dire si elle est sensible aux antibiotiques et présente le génotype de la souche sauvage. Il sera alors important de comprendre comment elle a pu échapper à l'évolution vers le ST2 et de savoir s'il existe un réservoir de souches appartenant au ST1 en France.

La capacité du ST3 à acquérir facilement des mutations *in vitro* sous pression de sélection reste, à ce jour, inexplicée. Chez plusieurs bactéries, la présence d'un système d'efflux a été démontrée comme essentielle dans l'acquisition de la résistance par mutation de la cible (136). En effet les pompes à efflux permettent aux bactéries de survivre en limitant leur exposition à une concentration sub-inhibitrice de l'agent antimicrobien. Cette exposition contribue à sélectionner les génotypes résistants (136). L'implication d'un efflux dans le comportement du ST3 a été recherchée. Des essais d'accumulations de l'enrofloxacin ont été menés pendant cette thèse afin de comparer le comportement des différents sous-types *in vitro*. Ces manipulations n'ont, hélas, pas permis d'aboutir à des résultats reproductibles en raison de conditions expérimentales difficiles à maîtriser (température, pH, conditions de mesures, caractéristiques physico-chimiques des molécules...). Par conséquent, l'hypothèse de l'existence d'un système d'efflux chez les isolats ST3, leur permettant l'acquisition plus rapide des mutations *in vitro*, reste à vérifier.

Contrairement à ce que nous avons pu observer chez *M. bovis*, il a été démontré récemment que *M. agalactiae*, un autre mycoplasme de ruminants très proche de *M. bovis* d'un point de vue génétique et phylogénétique, n'a pas évolué de façon aussi marquée vers la résistance (137). Une des perspectives de cette thèse et également un des objectifs d'étude de

l'équipe est de systématiser la caractérisation des mécanismes moléculaires de la résistance à l'ensemble des mycoplasmes des ruminants. Ainsi si les mécanismes impliqués sont les mêmes chez les différentes espèces, on pourrait lier une évolution différente vers la résistance avec des pratiques de traitements différentes ou d'autres mécanismes d'acquisition de la résistance. En effet, le génotype de résistance pourrait être sélectionné à travers deux mécanismes : 1) par accumulation des mutations séquentielles dans les différents gènes cibles sous pression des traitements antibiotiques (comme chez *M. bovis*), ou bien 2) par acquisition des gènes cibles, ayant déjà les mutations, par un transfert horizontal. Ce mécanisme d'acquisition de la résistance n'a jamais été démontré mais serait tout à fait compatible avec les échanges chromosomiques récemment mis en évidence chez les mycoplasmes *in vitro* (138). Un projet de thèse est en cours entre l'UMR et une UMR à Toulouse (INRA, ENVT 1225) pour explorer cette autre voie d'acquisition des mutations.

En conclusion, nos résultats montrent qu'en France, on assiste bien à une sélection d'une sous-population clonale d'isolats de *M. bovis* résistants aux macrolides et aux tétracyclines. Le mécanisme moléculaire sous-tendant ce phénotype multi-résistant est la modification génétique des sites d'interactions entre les molécules d'antibiotiques et les ARN ribosomiaux : ce génotype, A₉₆₅T/A₉₆₇T dans l'ARNr 16S et G₇₄₈A/A₂₀₅₈G dans l'ARNr 23S, explique à lui seul les niveaux de CMI observés (≥ 32 et ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ pour les tétracyclines et les macrolides respectivement). Pour les fluoroquinolones, même si les isolats cliniques résistants sont sporadiques, les résultats des expériences de sélections de mutants résistants *in vitro* et la possible augmentation de fréquence du ST3 soulignent l'importance d'une surveillance très active de la résistance. Les mutations aux positions 81/83 dans GyrA et 80/84 dans ParC sont responsables de CMI $\geq 16\mu\text{g/mL}$ aussi bien chez les isolats cliniques que les mutants sélectionnés *in vitro*.

Il est impératif d'étendre cette surveillance à d'autres isolats non issus de VIGIMYC. En effet, l'origine des isolats inclus dans cette étude pourrait être à l'origine d'un biais dans la mesure où ils sont collectés lorsque la pathologie est installée et que, très souvent, des traitements antibiotiques ont déjà été mis en place. Un nouveau projet est prévu au sein de l'UMR pour 2017 : il va s'intéresser à la diversité des isolats de *M. bovis* en élevage au tout début d'un épisode de BPIE et en amont de tout traitement puis à la diffusion d'un ou de clones résistants post antibiothérapie.

Les résultats acquis lors de cette thèse sur le modèle « *M. bovis* » pourront servir de base à l'étude d'autres espèces de mycoplasmes. Tout d'abord, un ciblage rapide à l'aide de CMI seuils permettra, par espèce, d'identifier rapidement des isolats résistants et leur proportion. Par la suite l'ensemble des points de mutation décrits chez *M. bovis* seront recherchés en première intention avant d'explorer l'existence d'autres points de mutation potentiels voire d'autres mécanismes de résistance comme l'efflux actif (décrit chez *M. hominis*) ou la protéine Tet(M) (décrite chez *M. hominis* et *Ureaplasma spp.*).

Références bibliographiques

1. **Gautier-Bouchardon AV, Ferre S, Le Grand D, Paoli A, Gay E, Poumarat F.** 2014. Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PLoS One* **9**:e87672.
2. **Poumarat F, Gautier-Bouchardon A, Bergonier D, Gay E, Tardy F.** 2016. Diversity and variation of antimicrobial susceptibility patterns over time in *M. agalactiae* isolates collected from sheep and goats in France. *J Appl Microbiol* doi:10.1111/jam.13083.
3. **Alanis AJ.** 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* **36**:697-705.
4. **Rodriguez-Rojas A, Rodriguez-Beltran J, Couce A, Blazquez J.** 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol* **303**:293-297.
5. **Foster PL.** 2007. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**:373-397.
6. **Kim W, Killam T, Sood V, Surette MG.** 2003. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* results in elevated resistance to multiple antibiotics. *J Bacteriol* **185**:3111-3117.
7. **Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, M BS, Martinez JL.** 2013. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol* **4**:103.
8. **Cox G, Wright GD.** 2013. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* **303**:287-292.
9. **Pages JM, Masi M, Barbe J.** 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends in Molecular Medicine* **11**:382-389.
10. **Piddock LJ.** 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **19**:382-402.
11. **Poole K.** 2000. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2233-2241.
12. **Denton M, Kerr KG.** 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* **11**:57-80.
13. **Stock I, Wiedemann B.** 2001. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. *J Med Microbiol* **50**:396-406.
14. **Pai H, Kim J, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N.** 2001. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:480-484.
15. **Lee EW, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T.** 2003. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3733-3738.
16. **Webber MA, Piddock LJ.** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **51**:9-11.
17. **Swenson JM, Tenover FC, Cefoxitin Disk Study G.** 2005. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* **43**:3818-3823.
18. **Cattoir V.** 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. In Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA (ed), *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*, Oklahoma City (OK).
19. **Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, 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. *The Lancet Infectious Diseases* **16**:161-168.
20. **Gu DX, Huang YL, Ma JH, Zhou HW, Fang Y, Cai JC, Hu YY, Zhang R.** 2016. Detection of colistin resistance gene *mcr-1* in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from an infant with diarrhea in China. *Antimicrob Agents Chemother* doi:10.1128/AAC.00476-16.

21. **Ferrandiz MJ, Oteo J, Aracil B, Gomez-Garces JL, De La Campa AG.** 1999. Drug efflux and *parC* mutations are involved in fluoroquinolone resistance in viridans group *streptococci*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:2520-2523.
22. **Weigel LM, Anderson GJ, Tenover FC.** 2002. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2582-2587.
23. **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S.** 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1271-1272.
24. **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S.** 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1647-1650.
25. **Champney WS, Burdine R.** 1995. Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:2141-2144.
26. **Chittum HS, Champney WS.** 1994. Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**:6192-6198.
27. **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.
28. **Leclercq R, Courvalin P.** 2002. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2727-2734.
29. **Lovmar M, Nilsson K, Lukk E, Vimberg V, Tenson T, Ehrenberg M.** 2009. Erythromycin resistance by L4/L22 mutations and resistance masking by drug efflux pump deficiency. *EMBO J* **28**:736-744.
30. **Weisblum B.** 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:577-585.
31. **Trieber CA, Taylor DE.** 2002. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol* **184**:2131-2140.
32. **Murray BE.** 1997. Vancomycin-resistant *enterococci*. *Am J Med* **102**:284-293.
33. **Burdett V.** 1996. Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *J Bacteriol* **178**:3246-3251.
34. **Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM.** 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar *Kentucky* and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:603-608.
35. **Hu YY, Cai JC, Zhang R, Zhou HW, Sun Q, Chen GX.** 2012. Emergence of *Proteus mirabilis* harboring blaKPC-2 and *qnrD* in a Chinese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:2278-2282.
36. **Mazzariol A, Kocsis B, Koncan R, Kocsis E, Lanzafame P, Cornaglia G.** 2012. Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clinical Microbiology and Infection* **18**:E46-48.
37. **van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ.** 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* **2**:203.
38. **Huovinen P, Sundstrom L, Swedberg G, Skold O.** 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:279-289.
39. **CLSI.** 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard _ Fourth Edition.
40. **CASFM.** 2016. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie-Récommandations 2016– Edition de février 2016. <http://www.sfm-microbiologie.org/>.
41. **Brown DF, Brown L.** 1991. Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* **27**:185-190.

42. **Hannan PC.** 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmology. *Vet Res* **31**:373-395.
43. **Sharma P, Vishwanath G.** 2012. Study of vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Annals of Tropical Medicine and Public Health* **5**:178-180.
44. **Chen S, Zhao S, McDermott PF, Schroeder CM, White DG, Meng J.** 2005. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol Cell Probes* **19**:195-201.
45. **Van belkum A, Wm. Michael Dunne J.** 2015. Pathogens: Wanted-dead or alive. *Microbe* **10**:513-520.
46. **Choi J, Jung YG, Kim J, Kim S, Jung Y, Na H, Kwon S.** 2013. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system. *Lab Chip* **13**:280-287.
47. **Razin S, Hayflick L.** 2010. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. *Biologicals* **38**:183-190.
48. **Brown DR, Bradbury JM.** 2013. The contentious taxonomy of Mollicutes, p 1-14. *In* Brown DF, Citti C (ed), *Mollicutes: Molecular biology and pathogenesis*. Caister Academic Press.
49. **Wolf M, Muller T, Dandekar T, Pollack JD.** 2004. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:871-875.
50. **Brown DR.** 2011. Phylum XVI. Tenericutes Murray 1984a, 356. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **4**:567-723.
51. **Bebear CM, Grau O, Charron A, Renaudin H, Gruson D, Bebear C.** 2000. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase (*gyrA*) gene from *Mycoplasma hominis* and characterization of quinolone-resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2719-2727.
52. **Atkinson TP, Balish MF, Waites KB.** 2008. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* **32**:956-973.
53. **Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J, et al.** 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol* **171**:6455-6467.
54. **Eaton MD, Meiklejohn G, van Herick W.** 1944. Studies on the Etiology of Primary Atypical Pneumonia : A Filterable Agent Transmissible to Cotton Rats, Hamsters, and Chick Embryos. *The Journal of Experimental Medicine* **79**:649-668.
55. **Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM, Fritchman RD, Weidman JF, Small KV, Sandusky M, Fuhrmann J, Nguyen D, Utterback TR, Saudek DM, Phillips CA, Merrick JM, Tomb JF, Dougherty BA, Bott KF, Hu PC, Lucier TS, Peterson SN, Smith HO, Hutchison CA, 3rd, Venter JC.** 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**:397-403.
56. **Barre A, de Daruvar A, Blanchard A.** 2004. MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic Acids Res* **32**:D307-310.
57. **Yamao F, Muto A, Kawauchi Y, Iwami M, Iwagami S, Azumi Y, Osawa S.** 1985. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc Natl Acad Sci U S A Biol Sci* **82**:2306-2309.
58. **Fischer A, Santana-Cruz I, Giglio M, Nadendla S, Drabek E, Vilei EM, Frey J, Jores J.** 2013. Genome Sequence of *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a Fast-Growing Mycoplasma Species. *Genome Announc* **1**.
59. **Nicholas R., Ayling R., Mcauliff L.** 2008. MYCOPLASMA DISEASES OF RUMINANTS. Edited by CAB International:239 pages.
60. **Heuvelink A, Reugebrink C, Mars J.** 2016. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands. *Vet Microbiol* **189**:1-7.

61. **Ayling RD, Rosales RS, Barden G, Gosney FL.** 2014. Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain. *Vet Rec* **175**:486.
62. **Lysnyansky I, Ayling RD.** 2016. *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility. *Frontiers in Microbiology* **7**:595.
63. **Uemura R, Sueyoshi M, Nagatomo H.** 2010. Antimicrobial susceptibilities of four species of *Mycoplasma* isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. *J Vet Med Sci* **72**:1661-1663.
64. **Askaa G, Henning E.** 1976. Elevation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to Species Rank: *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **26**: 323-325.
65. **Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED.** 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J Vet Intern Med* **25**:772-783.
66. **Wise KS, Calcutt MJ, Foecking MF, Roske K, Madupu R, Methe BA.** 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC 25523). *Infect Immun* **79**:982-983.
67. **Li Y, Zheng H, Liu Y, Jiang Y, Xin J, Chen W, Song Z.** 2011. The complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* strain Hubei-1. *PLoS One* **6**:e20999.
68. **Qi J, Guo A, Cui P, Chen Y, Mustafa R, Ba X, Hu C, Bai Z, Chen X, Shi L, Chen H.** 2012. Comparative Geno-Plasticity Analysis of *Mycoplasma bovis* HB0801 (Chinese Isolate). *PLoS One* **7**:e38239.
69. **Aebi M, Bodmer M, Frey J, Pilo P.** 2012. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Vet Microbiol* **157**:363-368.
70. **Aebi M, van den Borne BH, Raemy A, Steiner A, Pilo P, Bodmer M.** 2015. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta Vet Scand Suppl* **57**:10.
71. **Maunsell FP, Donovan GA, Risco C, Brown MB.** 2009. Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine* **27**:2781-2788.
72. **Radaelli E, Castiglioni V, Losa M, Benedetti V, Piccinini R, Nicholas RA, Scanziani E, Luini M.** 2011. Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a North Italian herd. *Res Vet Sci* **91**:251-253.
73. **Arcangioli MA, Becker CA.** 2013. PNEUMONIES ET BRONCHOPNEUMONIES, p 183-205. *In* Boileau M (ed), MALADIES DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE SUPÉRIEUR DES BOVINS.
74. **Citti C, Browing GF, Rosengarten R.** 2005. Phenotypic diversity and cell invasion in host subversion by pathogenic mycoplasmas. *Mycoplasmas: MOLECULAR BIOLOGY PATHOGENICITY AND STRATEGIES FOR CONTROL*:439-483.
75. **Prysljak T, Perez-Casal J.** 2016. Immune responses to *Mycoplasma bovis* proteins formulated with different adjuvants. *Can J Microbiol* **62**:492-504.
76. **Apley MD, Coetzee JF.** 2013. Antimicrobial Drug Use in Cattle, p 495-518. *In* Giguère S, Prescott JF, Dowling PM (ed), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth Edition* ed. John Wiley & Sons, Inc.
77. **De Briyne N, Atkinson J, Pokludova L, Borriello SP.** 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec* **175**:325.
78. **Ayling RD, Baker SE, Peek ML, Simon AJ, Nicholas RA.** 2000. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet Rec* **146**:745-747.
79. **Giguère S.** 2013. Macrolides, Azalides, and Ketolides. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth Edition*:211-231.
80. **Giguère S, Dowling PM.** 2013. Fluoroquinolones. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth Edition*:295-314.
81. **Nickell JS, White BJ.** 2010. Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **26**:285-301.
82. **Rerat M, Albin S, Jaquier V, Hussy D.** 2012. Bovine respiratory disease: efficacy of different prophylactic treatments in veal calves and antimicrobial resistance of isolated *Pasteurellaceae*. *Prev Vet Med* **103**:265-273.

83. **Hannan PC, Windsor GD, de Jong A, Schmeer N, Stegemann M.** 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2037-2040.
84. **Kroemer S, Galland D, Guerin-Faublee V, Giboin H, Woehrle-Fontaine F.** 2012. Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Vet Rec* **170**:53.
85. **Poumarat F, Longchambon D, Martel JL.** 1992. Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within "*M. mycoides* cluster" and within "glucose and arginine-negative cluster" of ruminant mycoplasmas. *Vet Microbiol* **32**:375-390.
86. **Poumarat F, Perrin B, Longchambon D.** 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet Microbiol* **29**:329-338.
87. **Poumarat F, Chazel M, Tardy F, Gaurivaud P, Arcangioli MA, Le Grand D, Calavas D.** 2009. VIGIMYC, le réseau national d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses des ruminants, bilan 2003-2007. *Bull Epidemiol Afssa* **31**:4-8.
88. **Poumarat F, Jarrige N, Tardy F.** 2014. Purpose and overview of results of the Vigimyc Network for the epidemiological surveillance of mycoplasmoses in ruminants in France. *EuroRéférence* **12**:24-28.
89. **Marenda MS, Sagne E, Poumarat F, Citti C.** 2005. Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiology* **151**:475-489.
90. **Subramaniam S, Bergonier D, Poumarat F, Capaul S, Schlatter Y, Nicolet J, Frey J.** 1998. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Mol Cell Probes* **12**:161-169.
91. **Bashiruddin JB, Frey J, Konigsson MH, Johansson KE, Hotzel H, Diller R, de Santis P, Botelho A, Ayling RD, Nicholas RA, Thiaucourt F, Sachse K.** 2005. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. *Vet J* **169**:268-275.
92. **Johansson K-E, Heldtander MUK, Pettersson B.** 1998. Characterization of Mycoplasmas by PCR and Sequence Analysis with Universal 16S rDNA Primers, p 145-165. *In* Miles R, Nicholas R (ed), *Mycoplasma Protocols* doi:10.1385/0-89603-525-5:145. Humana Press, Totowa, NJ.
93. **Pereyre S, Tardy F, Renaudin H, Cauvin E, Del Pra Netto Machado L, Tricot A, Benoit F, Treilles M, Bebear C.** 2013. Identification and subtyping of clinically relevant human and ruminant mycoplasmas using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* doi:10.1128/JCM.01573-13;Doi : 10.1128/JCM.01573-01513.
94. **Arcangioli MA, Aslan H, Tardy F, Poumarat F, Le Grand D.** 2012. The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in French calf feedlots. *Vet J* **192**:96-100.
95. **Becker CA, Thibault FM, Arcangioli MA, Tardy F.** 2015. Loss of diversity within *Mycoplasma bovis* isolates collected in France from bovines with respiratory diseases over the last 35 years. *Infect Genet Evol* **33**:118-126.
96. **Register KB, Thole L, Rosenbush RF, Minion FC.** 2015. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma bovis* reveals host-specific genotypes in cattle versus bison. *Vet Microbiol* **175**:92-98.
97. **Pinho L, Thompson G, Rosenbusch R, Carvalheira J.** 2012. Genotyping of *Mycoplasma bovis* isolates using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J Microbiol Methods* **88**:377-385.
98. **Sulyok KM, Kreizinger Z, Fekete L, Hrivnak V, Magyar T, Janosi S, Schweitzer N, Turcsanyi I, Makrai L, Erdelyi K, Gyuranecz M.** 2014. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe. *BMC Vet Res* **10**:256.
99. **Carter TC, He MM.** 2016. Challenges of Identifying Clinically Actionable Genetic Variants for Precision Medicine. *Journal of Healthcare Engineering* **2016**.

100. **Chopra I, Roberts M.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:232-260.
101. **Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V.** 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**:1143-1154.
102. **Waites KB, Lysnyansky I, Bébéar CM.** 2013. Emerging antimicrobial resistance in *Mycoplasmas* of humans and animals, p 289-322. *In* Browning GF, Citti C (ed), *Mollicutes - Molecular Biology and Pathogenesis*.
103. **Degrange S, Renaudin H, Charron A, Pereyre S, Bebear C, Bebear CM.** 2008. Reduced susceptibility to tetracyclines is associated in vitro with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **61**:1390-1392.
104. **de Barbeyrac B, Dupon M, Rodriguez P, Renaudin H, Bebear C.** 1996. A Tn1545-like transposon carries the tet(M) gene in tetracycline resistant strains of *Bacteroides ureolyticus* as well as *Ureaplasma urealyticum* but not *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* **37**:223-232.
105. **Roberts MC, Koutsky LA, Holmes KK, LeBlanc DJ, Kenny GE.** 1985. Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain streptococcal *tetM* sequences. *Antimicrob Agents Chemother* **28**:141-143.
106. **Del castillo JRE.** 2013. Tetracyclines. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth Edition*:257-268.
107. **Amram E, Mikula I, Schnee C, Ayling RD, Nicholas RA, Rosales RS, Harrus S, Lysnyansky I.** 2015. 16S rRNA gene mutations associated with decreased susceptibility to tetracycline in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:796-802.
108. **Ayling RD, Baker SE, Peek ML, Simon AJ, Nicholas RA.** 2000. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet Rec* **146**:745-747.
109. **Thomas A, Nicolas C, Dizier I, Mainil J, Linden A.** 2003. Antibiotic susceptibilities of recent isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium. *Vet Rec* **153**:428-431.
110. **Gerchman I, Levisohn S, Mikula I, Lysnyansky I.** 2009. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle. *Vet Microbiol* **137**:268-275.
111. **Giguère S.** 2013. Macrolides, Azalides, and Ketolides, p 211-231. *In* Giguère S, Prescott JF, Dowling PM (ed), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth Edition* ed. John Wiley & Sons, Inc.
112. **Schlunzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, Yonath A, Franceschi F.** 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**:814-821.
113. **Suzuki S, Yamazaki T, Narita M, Okazaki N, Suzuki I, Andoh T, Matsuoka M, Kenri T, Arakawa Y, Sasaki T.** 2006. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:709-712.
114. **Wolff BJ, Thacker WL, Schwartz SB, Winchell JM.** 2008. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3542-3549.
115. **Xin D, Mi Z, Han X, Qin L, Li J, Wei T, Chen X, Ma S, Hou A, Li G, Shi D.** 2009. Molecular mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae* from China. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:2158-2159.
116. **Pereyre S, Charron A, Renaudin H, Bebear C, Bebear CM.** 2007. First report of macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in the P1 adhesin gene in *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains isolated in France over 12 years. *J Clin Microbiol* **45**:3534-3539.

117. **Peuchant O, Menard A, Renaudin H, Morozumi M, Ubukata K, Bebear CM, Pereyre S.** 2009. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. *J Antimicrob Chemother* **64**:52-58.
118. **Pereyre S, Gonzalez P, De Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, Raheison S, Bebear C, Bebear CM.** 2002. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3142-3150.
119. **Lerner U, Amram E, Ayling RD, Mikula I, Gerchman I, Harrus S, Teff D, Yogev D, Lysnyansky I.** 2014. Acquired resistance to the 16-membered macrolides tylosin and tilmicosin by *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol* **168**:365-371.
120. **Kong LC, Gao D, Jia BY, Wang Z, Gao YH, Pei ZH, Liu SM, Xin JQ, Ma HX.** 2015. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma bovis* isolates from multiple provinces in China. *J Vet Med Sci* **78**:293-296.
121. **Gharaibeh S, Al-Rashdan M.** 2011. Change in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* field isolates. *Vet Microbiol* **150**:379-383.
122. **Gharaibeh S, Laibinis V, Wooten R, Stabler L, Ferguson-Noel N.** 2011. Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Jordan. *Avian Dis* **55**:212-216.
123. **Gruson D, Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM.** 2005. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1190-1193.
124. **Sato T, Okubo T, Usui M, Higuchi H, Tamura Y.** 2013. Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves. *J Vet Med Sci* **75**:1063-1065.
125. **Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Clerc M, Pereyre S, Bebear C.** 2003. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3323-3325.
126. **Reinhardt AK, Bebear CM, Kobisch M, Kempf I, Gautier-Bouchardon AV.** 2002. Characterization of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV Involved in quinolone resistance of *Mycoplasma gallisepticum* mutants obtained in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:590-593.
127. **Raheison S, Gonzalez P, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM.** 2002. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:672-679.
128. **Raheison S, Gonzalez P, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM.** 2005. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:421-424.
129. **Lysnyansky I, Mikula I, Gerchman I, Levisohn S.** 2009. Rapid detection of a point mutation in the *parC* gene associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4911-4914.
130. **Rosenbusch RF, Kinyon JM, Apley M, Funk ND, Smith S, Hoffman LJ.** 2005. In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. *J Vet Diagn Investig* **17**:436-441.
131. **Barberio A, Flaminio B, De Vlieghe S, Supre K, Kromker V, Garbarino C, Arrigoni N, Zanardi G, Bertocchi L, Gobbo F, Catania S, Moroni P.** 2016. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates identified in milk from dairy cattle in Belgium, Germany, and Italy. *J Dairy Sci* **99**:6578-6584. .
132. **Mulongo M, Prysljak T, Perez-Casal J.** 2013. Vaccination of feedlot cattle with extracts and membrane fractions from two *Mycoplasma bovis* isolates results in strong humoral immune responses but does not protect against an experimental challenge. *Vaccine* **31**:1406-1412.
133. **Soehnen MK, Aydin A, Lengerich EJ, Houser BA, Fenton GD, Lyszczek HR, Burns CM, Byler LI, Hattel AL, Wolfgang DR, Jayarao BM.** 2011. Blinded, controlled field trial of two

- commercially available *Mycoplasma bovis* bacterin vaccines in veal calves. *Vaccine* **29**:5347-5354.
134. **del Castillo JRE.** 2013. Tetracyclines, p 257-268. *In* Giguère S, Prescott JF, Dowling PM (ed), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth Edition* ed. John Wiley & Sons, Inc.
135. **Khalil D, Becker CA, Tardy F.** 2016. Alterations in the Quinolone Resistance-Determining Regions and Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates and Laboratory-Derived Mutants of *Mycoplasma bovis*: Not All Genotypes May Be Equal. *Appl Environ Microbiol* **82**:1060-1068.
136. **Antunes NT, Assuncao P, Poveda JB, Tavio MM.** 2015. Mechanisms involved in quinolone resistance in *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Vet J* **204**:327-332.
137. **Poumarat F, Gautier-Bouchardon A, Bergonier D, Gay E, Tardy F.** 2016. Diversity and variation of antimicrobial susceptibility patterns over time in *M. agalactiae* isolates collected from sheep and goats in France. *J Appl Microbiol* doi:10.1111/jam.13083.
138. **Dordet-Frisoni E, Sagne E, Baranowski E, Breton M, Nouvel LX, Blanchard A, Marena MS, Tardy F, Sirand-Pugnet P, Citti C.** 2014. Chromosomal transfers in mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. *MBio* **5**:DOI : 10.1128/mBio.01958-01914.