

ETUDE DE L'EVOLUTION TEMPORELLE DE LA RESISTANCE ET DE LA VIRULENCE DES *E. COLI* INTESTINAUX DU POULET DE CHAIR

Mourand Gwenaelle¹, Le Devendec Laetitia¹, Dieng Gilbert¹, Keita Alassane¹, Amelot Michel¹, Jaunet Hervé², Dia Mohamed El Hassimiou² et Kempf Isabelle¹

¹ Anses laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Zoopole les croix, 22440 Ploufragan, France

² ZOOPOLE développement, 2 rue Jean Rostand - BP 7, 22440 Ploufragan

Isabelle.Kempf@anses.fr

RÉSUMÉ

L'évolution de la population d'*Escherichia coli* résistants à différents antibiotiques ou porteurs de gènes de virulence a été étudiée au cours de la vie de poulets de chair. Deux expérimentations ont été conduites en animaleries protégées sur poussins conventionnels élevés sur litière. A l'âge d'un jour, la moitié des poussins (premier essai) ou tous les poussins (second essai) ont été inoculés par voie orale avec deux souches d'*E. coli* résistantes au cefotaxime, cefoxitine, tétracycline, fluoroquinolones, triméthoprine et/ou sulfamides. Des prélèvements de matières fécales ont été collectés chaque semaine, ainsi que les caeca des oiseaux sacrifiés à 2, 3 ou 6 semaines d'âge. Les titres d'*E. coli* totaux ou résistants à différents antibiotiques ont été déterminés et la présence de quatre gènes de virulence (*ompT*, *iutA*, *iroN* et *iss*) a été recherchée.

Aucun *E. coli* résistant au céfotaxime ou à la céfoxitine n'a été détecté chez les sujets non-inoculés. Pour le premier essai, les deux souches ont colonisé tous les oiseaux inoculés. Leurs titres dans les matières fécales ont décliné régulièrement de J7 à J41, mais tous les caeca des oiseaux sacrifiés à J42 étaient positifs. La caractérisation des isolats a montré que les gènes de résistance *bla*_{CMY-2} ou *bla*_{CTX-M-1} présents dans les souches inoculées pouvaient être transférés vers d'autres *E. coli* commensaux des poulets. Pour le second essai, les titres d'*E. coli* résistants au céfotaxime, à la céfoxitine et à la gentamicine ont montré une décroissance, mais les nombres d'*E. coli* résistants à la ciprofloxacine étaient stables. Le nombre de gènes de virulence d'*E. coli* par souche semble également globalement décroître lors des premières semaines. Cette étude montre que les populations d'*E. coli* du poulet de chair évoluent avec l'âge des oiseaux. Des transferts spontanés de gènes de résistance sont observés.

ABSTRACT

Time evolution of resistance and virulence of broilers intestinal *Escherichia coli*

The evolution of the antimicrobial-resistant and virulence genes-carrying intestinal *E. coli* was studied during the broiler lifetime. Two experiments were conducted on conventional chicks in animal facilities. At one day of age, chicks were orally inoculated or not inoculated with two *E. coli* strains resistant to cefotaxime, cefoxitin, tetracycline, fluoroquinolones, trimethoprine and/ or sulfonamides. Fecal samples were collected weekly, and ceca were obtained from birds sacrificed at 2, 3 or 6 weeks of age. Titers of *E. coli* or *E. coli* resistant to different antimicrobials were determined, as well as the presence of virulence genes.

No cefotaxime- or cefoxitin-resistant *E. coli* was isolated from non-inoculated birds. For the first trial, the two strains colonized all inoculated birds. Their titers decreased regularly from Day 7 to Day 41, but ceca from all birds sacrificed on Day 42 were still positive. The resistance genes of the inoculated strains, *bla*_{CMY-2} or *bla*_{CTX-M-1}, were transferred to other commensal *E. coli* strains. For the second trial, titers of *E. coli* resistant to cefotaxime, cefoxitin and gentamicin decreased but the numbers of ciprofloxacin-resistant *E. coli* were stable. Ratios of virulence genes also varied with time. Globally this study shows that the broiler *E. coli* population varies with time. Spontaneous transfer of resistance genes occurs.

INTRODUCTION

L'antibiorésistance est un problème majeur de santé animale et de santé publique. Les *Escherichia coli* résistants présents dans le microbiote des poulets peuvent être à l'origine de colibacillooses aviaires et constituent également un réservoir de bactéries et de gènes de résistance susceptibles de contaminer la chaîne alimentaire, par le biais de carcasses souillées, et l'environnement lors de l'épandage des effluents. L'objectif de notre étude est d'analyser l'évolution de la population d'*E. coli* résistants à différents antibiotiques d'intérêt majeur (céphalosporines, fluoroquinolones, gentamicine) au cours de la vie de poulets de chair. Pour cela, deux expérimentations ont été conduites, sur des poussins conventionnels élevés en animaleries protégées, et inoculés ou non avec des souches multi-résistantes. Les proportions de souches d'*E. coli* porteuses de gènes de virulence extra-intestinale ont également été étudiées, en se focalisant sur les gènes prédictors d'APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) décrits par Johnson et al. (2008).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Souches bactériennes

Deux souches d'*E. coli*, COV36 et COV38, isolées de poulets ont été utilisées. COV36 est résistante aux céfoxitine (FOX), ceftriaxone, triméthoprim sulfamides, tétracyclines et streptomycine. Elle contient un plasmide de type IncII/ST12 portant le gène *bla_{CMY-2}*. COV38 est résistante aux céfotaxime (CTX), sulfamides, tétracycline, ciprofloxacine et streptomycine, et contient un plasmide de type IncII/ST3 contenant les gènes *bla_{CTX-M-1}*, *tetA* et *sul2*. COV36 et COV38 appartiennent respectivement aux groupes phylogénétiques C et B1.

1.2. Protocole expérimental

Des poussins de chair conventionnels Ross 308 ont été élevés sur litière (n=90 pour le premier essai, n=180 pour le second essai). A l'âge d'un jour, la moitié des poussins (premier essai) ou tous les poussins (second essai) ont été inoculés par voie orale avec les deux souches d'*E. coli* (par poussin, environ 9700 CFU de chaque souche pour le premier essai, et environ 440 CFU pour le second essai). L'autre moitié des poussins du premier essai a été inoculée avec un milieu stérile. Les oiseaux non inoculés sont élevés dans une animalerie séparée. Des prélèvements de matières fécales ont été collectés chaque semaine, ainsi que les caeca des oiseaux sacrifiés à 2, 3 ou 6 semaines d'âge.

1.3. Analyse des prélèvements

Les titres d'*E. coli* totaux ou résistants à FOX, CTX, ainsi que pour le second essai à la ciprofloxacine (CIP) et à la gentamicine (GEN) ont été déterminés par ensemencement sur milieux supplémentés. Les isolats résistants ont été identifiés et caractérisés par PCR (groupes phylogénétiques (Clermont et al., 2013), présence de gènes de résistance *bla_{CMY-2}* ou *bla_{CTX-M-1}*). De plus, pour le second essai, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ciprofloxacine ou de gentamicine ont été déterminées selon le CLSI M7-A10. Les seuils de résistance utilisés sont >0,06 mg/L pour la ciprofloxacine et >8 mg/L pour la gentamicine. Egalement pour le second essai, les gènes de virulence *iutA*, *iss*, *iroN* et *ompT* ont été recherchés par PCR. La souche *E. coli* BEN2908 (C. Schouler, INRA Nouzilly) a été utilisée comme témoin positif pour la recherche des gènes de virulence.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Premier essai

Aucun *E. coli* résistant à FOX ou CTX n'est détecté dans les matières fécales ou les caeca des oiseaux non-inoculés, confirmant l'absence de contamination initiale des poussins et l'efficacité des mesures de biosécurité entre les animaleries.

L'analyse des isolats provenant des oiseaux inoculés montre que plus de 90% possèdent le gène attendu (*bla_{CMY-2}* pour ceux obtenus sur milieu avec FOX et *bla_{CTX-M-1}* sur milieu avec CTX). La majorité de ces isolats correspond aux souches inoculées, mais certains *E. coli* porteurs de *bla_{CMY-2}* ou *bla_{CTX-M-1}* appartiennent à d'autres groupes phylogénétiques, révélant un transfert spontané de ces gènes de résistance vers des souches commensales des poulets. Les cultures des matières fécales sur milieux supplémentés en FOX ou CTX montrent des titres élevés lors des premières semaines, baissant ensuite progressivement (Tableau 1). Les caeca des poulets sacrifiés 14, 21 ou 42 jours sont tous positifs pour les milieux supplémentés en FOX ou CTX et révèlent la persistance jusqu'à l'âge d'abattage des poulets de chair des souches inoculées et/ou de souches ayant acquis *bla_{CMY-2}* ou *bla_{CTX-M-1}*.

2.2. Second essai

L'analyse des CMI d'une cinquantaine d'isolats obtenus sur les milieux supplémentés en CIP ou en GEN confirme que respectivement 100% et 90% sont effectivement résistants à ces molécules. La majorité des isolats obtenus sur milieux supplémentés en FOX ou CTX contient le gène *bla_{CMY-2}*, et non le gène *bla_{CTX-M-1}*, ce qui semble indiquer que la souche COV38 ne s'est pas implantée, peut-être en raison du plus faible inoculum utilisé lors du second essai. Le gène *bla_{CMY-2}* est présent dans d'autres isolats que COV36, suggérant un transfert de ce gène de la

souche COV36 vers d'autres souches commensales des oiseaux.

Les titres d'*E. coli* totaux dans les matières fécales varient peu au cours du temps (Tableau 2). Les titres des *E. coli* résistants à FOX, CTX ou GEN montrent une décroissance, mais les nombres d'*E. coli* résistants à CIP sont stables et représentent une part importante de la population des *E. coli* totaux. Ces *E. coli* résistants à CIP ne contiennent pas les gènes *bla*_{CMY-2}, ou *bla*_{CTX-M-1}, et correspondent probablement à des souches commensales déjà présentes chez le poussin.

Tous les 90 poulets sacrifiés à 21 jours d'âge hébergent des *E. coli* résistants à CTX, FOX, GEN ou CIP dans leurs caeca. Pour les 60 poulets sacrifiés à 42 jours, tous les caeca sont positifs sur milieux supplémentés en GEN ou CIP, et 21 (35%) ou 49 (82%) sont positifs sur milieux supplémentés en CTX ou FOX respectivement.

La recherche de quatre facteurs de virulence pour deux souches par poulet et par date de J5 à J35 montre que chaque oiseau peut être porteur de souches différentes, ainsi qu'observé par Kemmet et al (2013), utilisant un panel de gènes de virulence différent.

A J5, l'analyse de deux isolats par poussin montre que pour neuf des 33 poussins, les deux souches possèdent

les quatre gènes de virulence recherchés. Six profils de virulence différents sont détectés. Plus de 80% des isolats possèdent les gènes *iroN*, *ompT* et *iss*. En moyenne à J5, chaque souche de *E. coli* contient plus de trois des quatre gènes recherchés. Ce nombre moyen de gènes de virulence par souche diminue ensuite pour être inférieur ou proche de 1,5 à J14 et J20 mais est compris entre 2 et 3 à J28, J35 et J41. De même, dans une étude terrain, Kemmet et al. (2013), observaient des variations de la proportion des souches d'*E. coli* pathogènes, avec l'âge des oiseaux.

CONCLUSION

Cette expérimentation nous a permis de décrire l'évolution du portage de souches de *E. coli* résistantes ou porteuses de gènes de virulence au cours de la vie de poulets de chair. Les résultats montrent que des souches inoculées multirésistantes infectant les oiseaux dès le premier jour peuvent persister, à faible titre, jusqu'à l'âge d'abattage et transmettre leurs gènes de résistance à d'autres souches. Les sous-populations de *E. coli* résistants fluctuent dans le temps. La fréquence de gènes de virulence d'APEC dans les souches fécales semble diminuer au cours du temps. Ce phénomène sera prochainement étudié plus en détail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baron, S., Jouy, E., Touzain, F., Bougeard, S., Larvor, E., de Boisseson, C., Amelot, M., Keita, A., Kempf, I., 2016. Veterinary microbiology (185), 29-33.
- Clermont O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. Environmental microbiology reports 5, 58-65
- Kemmett, Kirsty, Tom Humphrey, Steven Rushton, Andrew Close, Paul Wigley, and Nicola J. Williams. 2013. , PLoS ONE (8) 67749.1-10
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K., 2008. J Clin Microbiol (46), 3987-3996.

Tableau 1. Premier essai : titres moyens obtenus pour les échantillons de matières fécales ensemencés sur milieux supplémentés en céfoxitine ou en céfotaxime

Jour	7	14	21	28	35	42
Nombre de prélèvements	10	20	25	23	21	21
FOX (16 mg/L)	6,8*	6,4	5,5	4,0	3,6	2,4
CTX (8 mg/L)	6,3	5,9	5,0	4,3	4,2	3,8

*Titre en Log10/g de matière fécale

Tableau 2. Deuxième essai : titres moyens obtenus pour les échantillons de matières fécales ensemencés sur milieux non supplémentés ou supplémentés en céfoxitine, céfotaxime, gentamicine ou ciprofloxacine

Jour	5	14	20	28	35	41
Nombre de prélèvements	50	101	80	75	75	76
Non supplémenté	6,3*	5,2	6,0	5,2	6,2	5,9
FOX (32 mg/L)	4,2	4,1	2,9	1,2	1,5	0,8
CTX (8 mg/L)	3,9	3,7	2,8	0,5	0,7	0,2
GEN (8 mg/L)	4,3	5,2	4,1	1,9	1,5	1,5
CIP (0,06 mg/L)	5,6	4,9	5,9	4,4	5,6	4,9

*Titre en Log10/g de matière fécale

Tableau 3. Deuxième essai : titres moyens obtenus pour les échantillons de caeca ensemencés sur milieux non supplémentés ou supplémentés en céfoxitine, céfotaxime, gentamicine ou ciprofloxacine

Jour	Nombre de prélèvements	Milieu MacConkey				
		Non supplémenté	Cefotaxime 8 mg/L	Céfoxitine 32 mg/L	Gentamicine 8 mg/L	Ciprofloxacine 0.06 mg/L
21	90	7,8*	4,3	4,7	5,6	7,0
42	60	7,7	0,9	2,5	3,7	7,6

*Titre en Log10/g de matière fécale