

# ETUDE DE LA COLONISATION DU TUBE DIGESTIF DU POUSSIN AXENIQUE PAR DES SOUCHES D'*E. COLI* SENSIBLES OU RESISTANTES A L'ENROFLOXACINE.

Le Fur Brigitte (1, 2), Mouline C. (1), Chaslus-Dancla Elisabeth (1), Guillot J. F. (1, 2).

<sup>1</sup> INRA. Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie. 37380 Nouzilly

<sup>2</sup> Université de Tours, Faculté des Sciences et Techniques. 37200 Tours

## Résumé

Nous avons suivi la colonisation du poulet axénique par trois couples de souches d'*Escherichia coli*: une souche aviaire non pathogène et un mutant isogénique résistant à l'enrofloxacin (3 µg/ml) obtenu *in vitro*, une souche aviaire pathogène et un mutant isogénique résistant à l'enrofloxacin (2 µg/ml) obtenu également *in vitro*, une souche aviaire pathogène et un mutant résistant à haut niveau (15 µg/ml) isolé en élevage. Les souches ont été administrées par voie orale simultanément ou de façon décalée dans le temps. Dans tous les cas les mutants résistants ne s'implantent et ne se maintiennent à un niveau comparable à celui des souches sensibles que si leur administration précède celle de la souche sensible. Mais seul le mutant "terrain" s'implante et représente environ 50% de la population bactérienne s'il est inoculé simultanément ou après la souche sensible.

## COLONIZATION OF AXENIC CHICKEN GUT BY ENROFLOXACINE SUSCEPTIBLE OR RESISTANT *E. coli*.

### Abstract

The colonization of axenic chickens by three pairs of *E. coli* strains has been studied: a non pathogenic avian strain and an isogenic enrofloxacin-resistant mutant selected *in vitro*, an avian pathogenic strain and an isogenic mutant selected *in vitro*, an avian pathogenic strain and a highly enrofloxacin-resistant isolated from a poultry farm.

The isogenic resistant mutants colonize the gut and multiply at a level similar to the level of susceptible strains only if they are inoculated before the susceptible strain. The resistant field strain only was capable to colonize at about 50 % of the level of multiplication of the non-isogenic laboratory strain . if the former was inoculated following or simultaneously with the susceptible strain.

### Introduction

Les quinolones sont une classe importante d'antibiotiques bactéricides à large spectre. L'enrofloxacin est une fluoroquinolone à usage strictement vétérinaire. Les fluoroquinolones ont pour cible l'ADN gyrase (1,2) et le principal mécanisme de résistance actuellement décrit met en jeu des mutations chromosomiques. Récemment des interrogations ont été formulées sur les risques liés à l'utilisation des fluoroquinolones (3). Des mutants résistants sont en effet apparus chez différentes espèces bactériennes dont *E. coli*, *Campylobacter* et *Salmonella* (4, 5, 6).

C'est la raison pour laquelle nous avons étudié le devenir de mutants d'*E. coli* résistants à l'enrofloxacin dans la flore digestive de poulets, en comparant leur capacité de colonisation avec celle des souches sensibles isogéniques. Nous avons également étudié dans les mêmes conditions, le comportement d'une souche "terrain".

### Matériel et Méthodes

Les poussins nés axéniques de race Leghorn blanche sont transférés le 4<sup>e</sup> jour après éclosion en isolateurs d'élevage pour toute la durée des expériences. Chaque expérience a été réalisée sur des lots de 15 à 20 poussins issus de la même éclosion. Ils sont inoculés per os individuellement les 7<sup>e</sup> et 14<sup>e</sup> jours avec les souches résistantes et sensibles. L'inoculum est constitué de 10<sup>8</sup> à 10<sup>9</sup> bactéries en bouillon de 24 heures. Le matériel, l'aliment et l'eau de boisson sont stériles et introduits par un sas.

Les fèces sont prélevées individuellement sur tous les poussins les 7<sup>e</sup>, 14<sup>e</sup>, 24<sup>e</sup> et 41<sup>e</sup> jours. La flore totale est dénombrée par la technique des UFC sur milieu de Mueller-Hinton ou de Drigalski additionnés ou non

d'enrofloxacin à la concentration finale de 1 µg/ml. Les résultats représentent la valeur moyenne calculée à partir des résultats individuels. Le seuil de détection est de 100 bactéries/g de fèces.

*Souches d'E.coli aviaires et mutants utilisés:* La souche *E.coli* EC 79 est non pathogène alors que la souche MT 78 est pathogène en association avec des virus à tropisme respiratoire. Elles sont sensibles aux principales familles d'antibiotiques.

Le mutant 1322 et le mutant BLF ont été obtenus *in vitro* respectivement à partir des souches EC 79 et MT 78 par passages successifs sur géloses additionnées de quantités croissantes d'enrofloxacin.

Pour le mutant 1322, la CMI d'enrofloxacin est de 3 µg/ml. Il est résistant à toutes les quinolones, au chloramphénicol et à la tétracycline. Pour le mutant BLF, la CMI d'enrofloxacin est de 2 µg/ml. Il est résistant à toutes les quinolones, au chloramphénicol et à la tétracycline. Le mutant terrain I/B 17 a été isolé d'un prélèvement pathologique effectué en élevage avicole. La CMI d'enrofloxacin est de 15 µg/ml. Il est résistant à toutes les quinolones, à l'ampicilline, la streptomycine, et à la tétracycline. Il est sensible à la kanamycine, au chloramphénicol et au triméthoprim.

## Résultats

En implantation monoxénique les 5 souches étudiées colonisent le tube digestif de façon similaire.

**Expérience 1:** *Comparaison d'implantation de la souche EC 79 avec le mutant isogénique 1322.*

Le mutant 1322 lorsqu'il est inoculé simultanément ou 7 jours après la souche sensible est indétectable. Ceci signifie que s'il est présent sa concentration est inférieure à 10<sup>2</sup> bactéries/g de fèces (Fig. 1 et 2). Lorsque le mutant est inoculé 7 jours avant la souche sensible, il colonise le tube digestif de façon identique à celle-ci (Fig. 3).

**Expérience 2:** *Comparaison d'implantation de la souche MT 78 avec le mutant isogénique BLF.*

Le mutant BLF représente moins de 0,01 % de la flore lorsqu'il est inoculé simultanément ou après la souche sensible MT 78 (Fig. 4 et 5). Lorsqu'il est inoculé avant la souche sensible, il constitue en moyenne 10% de la flore totale (Fig. 6).

**Expérience 3:** *Comparaison d'implantation de la souche MT 78 avec le mutant terrain I/B 17.*

Le mutant I/B 17 constitue 10 à 50% de la flore totale s'il est inoculé simultanément ou après la souche sensible MT 78 (Fig. 7). Il représente 80% de la flore lorsqu'il est inoculé en premier (Fig. 8). Ces résultats semblent aussi révéler l'aptitude de ce mutant isolé d'élevage à s'implanter chez l'animal.

## Conclusion

Dans ces 3 expériences, les mutants résistants s'implantent au même niveau que les souches sensibles s'ils sont inoculés seuls ou en premier. Par contre, en implantation simultanée ou en deuxième position, la taille de population atteinte par les mutants isogéniques est inférieure à 0,01% de la flore totale. Le mutant terrain pathogène au contraire représente 10 à 80 % de la flore totale quel que soit l'ordre d'inoculation. Néanmoins des études complémentaires utilisant des souches terrains isogéniques, seront nécessaires pour déterminer la compétition de colonisation entre des souches sensibles et résistantes.

La colonisation du tube digestif par des mutants résistants aux fluoroquinolones et leur diffusion ultérieure semblent conditionnées par l'ordre de contamination bactérienne des animaux ainsi que les caractéristiques intrinsèques de la souche. A ces phénomènes viennent s'ajouter en élevage l'effet global de résistance à la colonisation exercé par la microflore digestive.

## Références

1. Palumbo, M., B. Gatto, G. Zagotto et al. 1993. Trends in Microbiol. 1: 232-235.
2. Hoshini, K., A. Kitamura, I. Morrissey, et al. 1994. Antimicrob Agents Chemother. 38: 2623-2627.
3. T. R. Jr. Beam. 1994. ASM News. 60: 348-349.
4. Heisig, P., and R. Tschorny. 1994. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1284-1291.
5. Kern, W., E. Andriof, M. Oethinger, et al. 1994. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 681-687.
6. Jacobs-Reitsma, W.F., C.A. Kan and N.M. Bolder. 1994. Lett Appl. Microbiol. 19: 228-231.

