

**IMPACT D'UN TRAITEMENT PAR COLISTINE SUR LE MICROBIOTE
ET LE FUMIER DE VOLAILLES STOCKE OU COMPOSTE : BACTERIES
ET GENES DE RESISTANCE**

**Le Devendec Laetitia¹, Mourand Gwenaelle¹, Léaustic Julien¹, Rousset Nathalie²,
Galliot Pascal², Tavares Manuel¹, Keita Alassane¹ et Isabelle Kempf¹**

¹Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail,
Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, BP 53, 22440 Ploufragan,

²ITAVI - Antenne Ouest- UMT SANIVOL, Beaucemaine, 22440 Ploufragan, France

isabelle.kempf@anses.fr

RESUME

Les fumiers issus des lots de volailles traités peuvent contenir des antibiotiques et leurs métabolites, des bactéries résistantes et des gènes de résistance. Les modalités de gestion des fumiers avant épandage (simple stockage ou compostage) influent sur l'évolution de ces différents contaminants. Nous décrivons l'impact d'un traitement par la colistine de poulets de chair, sur la sensibilité à cet antibiotique de différentes bactéries cibles (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*Kpn*) et *Pseudomonas aeruginosa* (*Pae*)) de la flore intestinale ou environnementale. Puis l'impact du stockage ou du compostage des fumiers a été évalué en analysant la sensibilité des bactéries cibles, la présence de gènes de résistance et leur capacité de diffusion par conjugaison. Les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de sélection de souches résistantes à la colistine de *E. coli*, *Kpn* ou *Pae*. Des gènes de résistance vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques ont été détectés dès l'arrivée des poussins et persistaient jusque dans les fumiers après six semaines de stockage ou de compostage. Certains gènes de résistance pouvaient être transférés vers *E. coli* par conjugaison à partir de fumiers âgés de six semaines. La persistance dans les fumiers de gènes de résistance mobilisables doit inciter à rationaliser les traitements antibiotiques et à optimiser les modalités de gestion des fumiers.

ABSTRACT

Impact of colistin treatment on the microbiota and stored or composted manure of broilers: bacteria and resistance genes

Manures from treated flocks may contain antimicrobials and their metabolites, resistant bacteria and resistance genes. Management of manures (storing or composting) can influence the evolution of these contaminants. We describe here the impact of the administration of colistin to broilers on the susceptibility of target bacteria (*E. coli*, *K. pneumoniae* (*Kpn*) and *P. aeruginosa* (*Pae*)) of the microbiota and environment. Then the impact of storing or composting was studied by analysis of the susceptibility of target bacteria and the persistence of resistance genes and their ability to be transferred by conjugation. The selection of colistin-resistant *E. coli*, *Kpn* or *Pae* could not be evidenced. Genes coding for resistance to different families of antimicrobials could be detected on arrival of day-old chicks and persisted in stored or composted manures after six weeks. Some resistance genes could still be transferred from manures to *E. coli* after six weeks. The persistence of mobile resistance genes in manures highlights the need of a better use of antimicrobials and of improving manure management.

INTRODUCTION

Les antibiotiques sont fréquemment utilisés en aviculture, le plus souvent par voie orale. Ils sont susceptibles de modifier le microbiote intestinal et la sensibilité des bactéries qui le composent. Les fumiers issus des troupeaux traités peuvent contenir des antibiotiques et leurs métabolites, des bactéries résistantes et des gènes de résistance. Les modalités de gestion des fumiers avant épandage (simple stockage ou compostage) influent sur l'évolution de ces différents contaminants. Le projet DECRAB, financé par le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie (MEDDE) dans le cadre du projet EcoAntibio2017 vise à évaluer l'impact de l'utilisation des effluents d'élevages potentiellement contaminés par des résidus d'antibiotiques, bactéries résistantes ou gènes de résistance sur l'environnement. Il s'agit dans ce projet d'évaluer l'impact d'un traitement antibiotique de poulets et de différentes modalités de gestion du fumier, d'une part sur la résistance des bactéries fécales ou environnementales et d'autre part sur l'évolution des températures et de la composition physico-chimique du fumier. Cette communication expose l'effet d'un traitement par la colistine de poulets de chair, sur la sensibilité à cet antibiotique de différentes bactéries cibles de la flore fécale ou environnementale. L'évolution de ces bactéries et de différents gènes de résistance aux antibiotiques dans les fumiers des poulets traités ou non traités, qu'ils soient stockés ou compostés (par un retournement mécanique de l'andain après trois semaines de stockage), est également présentée. Une autre communication (Rousset et al, JRAPFG 2015) décrit l'impact du traitement des oiseaux et du mode de gestion des fumiers sur l'évolution physico-chimique des fumiers.

1. MATERIEL ET METHODES

Des poulets de chair à croissance rapide ont été élevés (33 jours d'élevage, densité d'environ 20 poulets/m²), dans un bâtiment de l'Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané. Ce bâtiment avec un sol bétonné est divisé en deux salles disposant d'un couloir central, et comprenant chacune 6 parquets de 70 m². Les animaux ont été élevés sur une litière de copeaux de bois non traités, disposée en une seule fois dans le bâtiment avant l'arrivée des poussins, à raison de 4 kg/m². Seuls les animaux de la salle 2 ont été traités par la colistine à la dose thérapeutique (Colivet solution CEVA, 37,5 ml de solution par tonne de poids vif), soit 75000 UI de colistine /kg de poids vif/jour de traitement, pendant cinq jours consécutifs. Ce traitement antibiotique a été administré dans l'eau de boisson, en veillant à évaluer chaque jour du traitement le poids des oiseaux, de manière à respecter

la posologie. Les poulets ont été traités durant la dernière semaine d'élevage. Au début du traitement, les poulets avaient donc 25 jours d'âge et pesaient en moyenne 1,129 kg. Des fonds de boîtes de livraison des poussins et des pools de fientes collectées avant, pendant, et après la période de traitement, ont été prélevés. Le fumier issu de la phase d'élevage a été utilisé pour constituer :

- deux andains avec du fumier issu de la salle 1 (andains non traités (NT)),
- et deux autres andains avec du fumier issus de la salle 2 (andains traités (T)).

Les quatre andains ont été stockés pendant 6 semaines sur une prairie. Le sol situé sous chaque andain a été préalablement recouvert d'une bâche plastique de type bâche d'ensilage en vue de récupérer les jus d'écoulement éventuels. Les quatre andains ont par ailleurs été recouverts d'une bâche géotextile Toptex en Polypropylène (Ets Gangloff) afin de les protéger des intempéries.

Deux d'entre eux (un andain traité et un andain non traité) ont été retournés au bout de 3 semaines pour favoriser le compostage du fumier (modalités TC et NTC : andains compostés), les deux autres sont restés en place durant les 6 semaines de stockage (modalités TS et NTS : andains stockés). Des prélèvements de fumier et de jus d'écoulement ont été collectés après trois et six semaines.

Les analyses bactériologiques et de biologie moléculaire ont visé à évaluer l'impact du traitement par la colistine, du stockage ou du compostage des fumiers sur la sensibilité de bactéries (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*Kpn*) et *Pseudomonas aeruginosa* (*Pae*)) à la colistine, et sur la présence de gènes de résistance vis-à-vis de différents antibiotiques, dans les matières fécales des poulets et dans les fumiers stockés ou compostés. La résistance à la colistine étant chromosomique et due à des mutations non encore parfaitement connues pour *E. coli* en particulier (Kempf, et al., 2013), nous avons suivi des gènes de résistance "marqueurs", très fréquemment présents comme par exemple, les gènes de résistance aux bêta-lactamines, tétracyclines, aminosides, macrolides ou sulfamides.

Les souches de *E. coli*, *Kpn* et *Pae* ont été isolées respectivement sur milieux MacConkey (MC) MC supplémenté (Tomas, et al., 1986), et milieu au cétrimide (Biorad), puis identifiées par PCR (Furet, et al., 2009, Shannon, et al., 2007). Leur sensibilité vis-à-vis de la colistine a été déterminée par dilution en milieu gélosé (Eucast, 2000) et interprétée selon les critères EUCAST. La recherche d'hétéro-résistance, consistant en la présence d'une sous-population résistante au sein d'une souche sensible, a été réalisée (Poudyal, et al., 2008). Des extraits d'ADN ont été préparés à partir de 250 µL d'une suspension au 1/10^{ème} de 10 g d'échantillons et ont été repris dans un volume final de 100 µL (Yu and Morrison, 2004), et les gènes de résistance vis-à-vis des bêta-lactamines (*bla*_{TEM-1} et *bla*_{CTX-M}), tétracyclines (*tetA*, *tetM*),

aminoglycosides (*strA*, *aadA1*), macrolides (*ermB*) et sulfamides (*sul1*, *sul2*) ont été détectés ou quantifiés par PCR quantitative en temps réel (Nolvak, et al., 2013, Aminov, et al., 2001, Pei, et al., 2006, Huerta, et al., 2013). La capture, par transfert conjugatif dans *E. coli* K-12 CV601gfp, de plasmides hébergeant des gènes de résistance a été testée à partir des seuls fumiers d'oiseaux traités, selon le protocole décrit par Kopmann et al (Kopmann, et al., 2013). Les transconjugants ont été recherchés sur milieux supplémentés en streptomycine, amoxicilline, triméthoprime ou tétracycline et les gènes de résistance ont été détectés par PCR.

Les moyennes des nombres de copies de gènes ont été comparées par un test de Kruskal-Wallis ou par un test de Mann-Whitney. Les distributions de souches résistantes ou hétéro-résistantes dans les différents lots ont été comparées à l'aide d'un test de Chi2 ou d'un test exact de Fisher.

2. RESULTATS

Sur les 347 isolats de *E. coli* obtenus au cours de la phase d'élevage, aucune souche résistante n'a été détectée : trois souches isolées du fumier juste après le départ des oiseaux étaient inhibées par 1 ou 2 mg/L de colistine (deux souches dans la salle 1 et une dans la salle 2), et toutes les autres souches montraient une CMI inférieure ou égale à 0,5 mg/L. Les proportions de souches hétéro-résistantes étaient de 8/122 et 3/155 pour les souches isolées de volailles non traitées et traitées respectivement ($p > 0,05$). Une seule souche de *E. coli* a été isolée des fumiers et jus. Obtenue après trois semaines d'un jus d'écoulement TC, elle s'est révélée sensible à la colistine.

Pour l'ensemble des prélèvements, seulement 36 souches de *Kpn* ont été isolées (34 en élevage, 2 sur les fumiers). Aucune n'était résistante et une seule souche de *Kpn*, obtenue dans la salle 1, était hétéro-résistante.

Au total, soixante souches de *Pae* ont été obtenues (22 de fientes ou fumiers non traités, 38 de fientes ou fumiers traités) dont sept étaient résistantes, sans différence significative entre lots. Il n'y avait pas non plus de différence significative pour la répartition de l'hétéro-résistance.

L'analyse par PCR en temps réel conduite sur les échantillons de matières fécales, litières et fumiers a permis de mettre en évidence la présence de gènes de résistance à l'ampicilline (*bla_{TEM-1}*), à la tétracycline (*tetA*, *tetM*), à la streptomycine (*strA*) et autres aminosides (*aadA*), aux macrolides (*ermB*) et aux sulfamides (*sul1*, *sul2*) dans la plupart des prélèvements (boîtes de transport des poussins, matières fécales, fumiers ou jus d'écoulement). Toutefois, le gène de résistance aux céphalosporines de troisième génération *bla_{CTX-M}* n'a jamais été détecté.

La quantification de deux gènes (*ermB* et *sul1*) a été réalisée dans les fumiers à trois et six semaines et est présentée sur la figure 1. Pour le gène *ermB*, les nombres de copies avoisinaient 10^4 - 10^5 copies / μ l d'ADN, à 3 et à 6 semaines, excepté pour le fumier NTC à 6 semaines, pour lequel le titre moyen n'était que de 10^3 copies/ μ l. La quantité du gène *ermB* dans le fumier NTC à six semaines était significativement inférieure à celle des autres fumiers à la même date et différait de la quantité détectée dans le même tas à trois semaines. Pour le gène *sul1*, les titres moyens étaient supérieurs à 10^5 copies/ μ l mis à part les lots TS et NTS à 3 et 6 semaines où ils étaient inférieurs à 10^5 copies/ μ l. Il n'y avait pas de différences significatives entre les lots à ces deux temps. Il n'y avait pas non plus de différences, pour chaque lot, entre les temps trois et six semaines.

La technique de capture par transfert conjugatif de plasmides a permis d'obtenir des transconjugants de *E. coli* ayant acquis des gènes de résistance à la tétracycline (*tetA*), la streptomycine (*strA*), aux aminosides (*aadA*) ou aux sulfamides (*sul1*). Ces transconjugants ont pu être obtenus à partir des fumiers d'oiseaux traités compostés après trois semaines ou de fumiers d'oiseaux traités et stockés après trois ou six semaines.

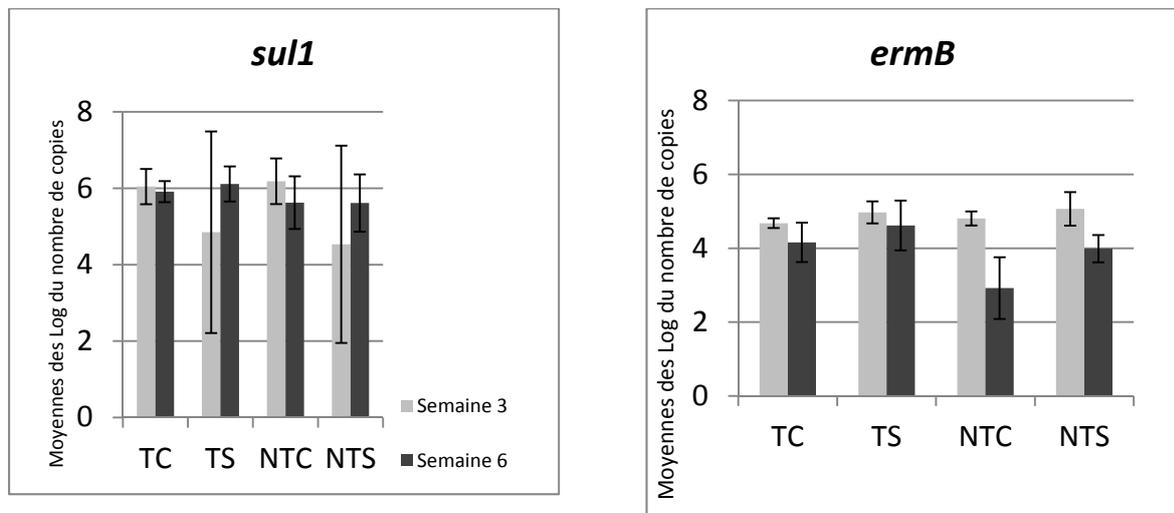
DISCUSSION - CONCLUSION

Le travail présenté ici visait à mettre en évidence l'impact d'un traitement par la colistine d'une part, et l'impact de modalités de gestion de fumiers d'autre part. La colistine a été administrée à la fin de la période d'élevage, permettant d'augmenter la quantité totale de colistine donnée aux oiseaux et de réduire le délai entre administration et récupération des fumiers, ce qui n'est pas la situation la plus souvent rencontrée, ni bien sûr le but recherché sur le terrain (C. Chauvin, Anses, communication personnelle). Le parti pris de l'étude était de tenter de maximiser le risque lié à l'administration de la colistine. Les analyses réalisées n'ont pas montré de sélection de résistance vis-à-vis de la colistine dans les populations dominantes de *E. coli*, *Kpn* ou *Pae*. Des gènes de résistance persistaient dans les andains et pouvaient encore être transférés par conjugaison vers une souche réceptrice de *E. coli* après six semaines de stockage ou de compostage. Ces résultats doivent inciter à réduire l'utilisation des antibiotiques et à optimiser les modalités de gestion des fumiers.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient K. Smalla, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik Julius Kühn-Institut, D-38104 Braunschweig pour la fourniture de la souche *E. coli* K-12 CV601gfp.

Figure 1 : Evolution des nombres de copies par microlitre d'ADN des gènes *sul1* et *ermB* dans les fumiers d'oiseaux traités ou non, stockés ou compostés, après trois ou six semaines



TC: traité, composté ; TS : traité stocké ; NTC : non traité, composté ; NTS : non traité, stocké.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kempf, I., M. A. Fleury, D. Drider, M. Bruneau, P. Sanders, C. Chauvin, J. Y. Madec and E. Jouy, 2013. *Int J Antimicrob Agents* (42) 379-83
2. Tomas, J. M., B. Ciurana and J. T. Jofre, 1986. *Appl Environ Microbiol* (51) 1361-3
3. Furet, J. P., O. Firmesse, M. Gourmelon, C. Bridonneau, J. Tap, S. Mondot, J. Dore and G. Corthier, 2009. *FEMS Microbiology Ecology* (68) 351-62
4. Shannon, K. E., D. Y. Lee, J. T. Trevors and L. A. Beaudette, 2007. *Sci Total Environ* (382) 121-9
5. Eucast., 2000. *Clinical Microbiology and Infection* (6) 509-5015.
6. Poudyal, A., B. P. Howden, J. M. Bell, W. Gao, R. J. Owen, J. D. Turnidge, R. L. Nation and J. Li, 2008. *J Antimicrob Chemother* (62) 1311-8
7. Yu, Z. and M. Morrison, 2004. *Biotechniques* (36) 808-12
8. Nolvak, H., M. Truu, K. Tiirik, K. Oopkaup, T. Sildvee, A. Kaasik, U. Mander and J. Truu, 2013. *Sci Total Environ* (461-462) 636-44
9. Aminov, R. I., N. Garrigues-Jeanjean and R. I. Mackie, 2001. *Appl Environ Microbiol* (67) 22-32
10. Pei, R., S. C. Kim, K. H. Carlson and A. Pruden, 2006. *Water Res* (40) 2427-35
11. Huerta, B., E. Marti, M. Gros, P. Lopez, M. Pompeo, J. Armengol, D. Barcelo, J. L. Balcazar, S. Rodriguez-Mozaz and R. Marce, 2013. *Sci Total Environ* (456-457) 161-70
12. Kopmann, C., S. Jechalke, I. Rosendahl, J. Groeneweg, E. Krogerrecklenfort, U. Zimmerling, V. Weichelt, J. Siemens, W. Amelung, H. Heuer and K. Smalla, 2013. *FEMS Microbiol Ecol* (83) 125-34