HAL
open science

Etat des lieux de l'antibiorésistance en élevage cunicole français et application du concept d'exclusion compétitive pour limiter la transmission d'un microbiote maternal antibiorésistant

Caroline Achard, Véronique Dupouy-Guiraute, Susanna Siviglia, Nathalie Arpaillange, Beatrice Gabinaud, Sylvie Combes, Yuliaxis Ramayo Caldas, Catherine C. Denis, Maria Ballester Davis Ballester, Stéphane Boucher, et al.

To cite this version:

Caroline Achard, Véronique Dupouy-Guiraute, Susanna Siviglia, Nathalie Arpaillange, Beatrice Gabinaud, et al.. Etat des lieux de l'antibiorésistance en élevage cunicole français et application du concept d'exclusion compétitive pour limiter la transmission d'un microbiote maternal antibiorésistant. 16. Journées de la Recherche Cunicole, Nov 2015, Le Mans, France. 264 p. hal-02744277

HAL Id: hal-02744277

https://hal.inrae.fr/hal-02744277

Submitted on 3 Jun 2020

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.

Etat des lieux de l'antibiorésistance en élevage cunicole français et application du concept d'exclusion compétitive pour limiter la transmission d'un microbiote maternel antibiorésistant

C. ACHARD[1*], V. DUPOUY[2*], S. SIVIGLIA[2], N. ARPAILLANGE[2], B. GABINAUD[1], S. COMBES[1], Y. RAMAYO-CALDAS[3], C. DENIS[3], M. BALLESTER[3], S. BOUCHER[4], B. DILE[4], S. CHATELLIER[5], B. LE NORMAND[5], A. CHAUBET[6], D. ESQUERRE[6], A. GHOZLANE[7], E. RUPPE[7], A. BOUSQUET-MELOU[2], J. ESTELLE[3], O. ZEMB[1]

[1] INRA, UMR1388 GenPhySE, Chemin de Borde-Rouge, 31326 Castanet-Tolosan,
[2] INRA, UMR1331 TOXALIM, Ecole Nationale Vétérinaire, Chemin des Capelles, 31000 Toulouse
[3] INRA, UMR1313 GABI, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas,
[4] Labovet, Reseau Cristal, Beaupréau et Les Herbiers,
[5] Clinique Vétérinaire des Marches de Bretagne, Fougères et St Brice en Cogles,
[6] INRA, GeT-PlaGe, Chemin de Borde-Rouge, 31326 Castanet-Tolosan,
[7] INRA, US1367 MetaGenoPolis, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas,
* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente

Résumé – Afin de proposer un système de maîtrise de l'antibiorésistance microbienne en élevage cunicole, nous avons identifié les gènes d'antibiorésistance stratégiques en France et testé une solution potentielle pour limiter le niveau d'antibiorésistance dans la flore digestive des lapins d'élevage. 102 gènes d'antibiorésistance ont été identifiés par analyse métagénomique des gènes microbiens issus de fèces de 30 lapines provenant d'élevages différents. Cinq des 10 gènes d'antibiorésistance les plus abondants confèrent une résistance à la tétracycline, antibiotique le plus utilisé dans le panel d'élevages. Les gènes de résistance aux tétracyclines sont plus abondants dans les échantillons issus d'élevages consommateurs d'antibiotiques. Les résultats de la PCR quantitative du gène *tetO* sont cohérents avec l'analyse métagénomique. Nous avons utilisé l'exclusion compétitive pour limiter la transmission d'antibiorésistance. Les lapereaux de 24 mères traitées à la tétracycline ont été utilisés dans les conditions standards d'élevage (n=5), dans des conditions de retrait des fèces maternelles (n=4) et dans le cas d'inoculation de 3 suspensions fécales pauvres en bactéries résistantes (n=5, 5 et 5). Le taux d'entérobactéries résistantes à la tétracycline dans les fèces de lapereaux après sevrage est moindre (45%, 48% et 10%) dans les lapereaux inoculés que dans le groupe contrôle (94%). Cette tendance doit être confirmée à l'aide d'un deuxième essai. L'exclusion compétitive appliquée pour limiter le niveau de résistance aux antibiotiques de la flore fécale ouvre des perspectives d'action en termes de techniques d'élevages reposant sur la coprophagie.

Abstract – Antibiotic resistance overview in French rabbit farms and limitation of antibiotic resistant microbiota transmission using competitive exclusion. In order to fight against antibiotic resistance in livestock, we need to know which antibiotic resistance genes (ARGs) are relevant in France and then lower their abundance. Out of the 102 ARGs identified by metagenomics across 30 French rabbit husbandries, 5 genes leading to tetracycline resistance belonged to the 10 most abundant ARGs. Quantitative PCR on *tetO* confirmed that the abundance using metagenomics is relevant. To lower ARGs abundance in kits, a control group was raised in standard conditions (n=5), a NF group had the maternal feces removed from the nest (n=4) and 3 groups were inoculated regularly with suspensions of fecal bacteria originating from farms using less antibiotics. The proportion of enterobacteria resistant to tetracyline was lower in the inoculated groups (45%, 48% and 10%) than in the control group (94%). This trend has to be confirmed in a second trial but competitive exclusion opens interesting means to fight against antibiotic resistant bacteria in livestock.

Introduction

La résistance aux antibiotiques est une menace pour la santé publique. En France, les élevages cunicoles consomment 7,5% des antibiotiques destinés aux animaux, mais les indicateurs d'exposition les placent en tête des filières devant les filières porcine et aviaire (Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2013, ANSES, 2014). C'est pourquoi la filière lapin s'est engagée de façon précurseur dans la réduction de l'usage des antibiotiques.

L'évaluation du risque d'antibiorésistance repose notamment sur l'étude de la flore commensale digestive. Chez l'homme, après une antibiothérapie, les gènes d'antibiorésistance peuvent se maintenir pendant plusieurs années dans le microbiote intestinal, même en l'absence d'un nouveau traitement antibiotique (Jernberg et al., 2007). L'émergence de gènes d'antibiorésistance en élevage est inquiétante car ces gènes peuvent diffuser depuis les animaux vers l'homme.

Il est en effet remarquable que les gènes trouvés dans les fèces humaines soient corrélés aux antibiotiques autorisés pour l'élevage des pays concernés (Forslund et al., 2013). Ces gènes peuvent diffuser vers les pathogènes au moyen de plasmides ou de phages (Muniesa et al., 2013). L'étude de l'antibiorésistance utilise des approches complémentaires de culture bactérienne ou de biologie moléculaire. Les techniques de culture microbiologique permettent de mesurer la sensibilité aux antibiotiques sur quelques espèces bactériennes facilement cultivables, notamment *E. coli* qui représente moins de 1% de la population bactérienne digestive. Les techniques de biologie moléculaire permettent de quantifier les gènes d'antibiorésistance de la totalité d'une population microbienne. Cependant la détection d'un gène ne garantit pas l'expression de la résistance.

Dans cette étude, nous avons utilisé une approche métagénomique pour détecter les gènes d'antibiorésistance connus dans la flore fécale de lapines provenant d'un panel de 30 élevages. Nous avons ensuite testé l'exclusion compétitive pour limiter la transmission de gènes d'antibiorésistance entre les mères et les jeunes animaux en inoculant des microbiotes sélectionnés pour leur faible niveau d'antibiorésistance à d es lapereaux élevés sous des mères présentant un fort niveau d'antibiorésistance.

1. Matériel et méthodes

1.1. Prélèvement de fèces et collectes d'information en élevages cunicoles

Des matières fécales ont été collectées à partir de lapines allaitantes en périsevrage provenant de 33 élevages cunicoles, sélectionnés pour leur pratiques d'élevage diversifiées, entre mai et octobre 2014. Les échantillons ont été immédiatement placés à 4°C avant d'être expédiés et conservés à -80°C. Des informations concernant les pratiques d'élevage (conduite, mode de renouvellement du cheptel, souche des lapines) ont été collectées à l 'aide d'un questionnaire. Les antibiotiques utilisés en maternité sur les trois dernières bandes précédant la collecte et leurs voies d'administration ont été répertoriés.

1.2. Détection des gènes d'antibiorésistance par séquençage et analyse métagénomique

L'ADN microbien a été extrait à partir de fèces en broyant les cellules au moyen de billes de verre avant d'être purifié par précipitation dans l'isopropanol (Mach et al., 2015). Le séquençage des gènes microbiens de 30 échantillons a été réalisé sur un appareil HiSeq 2500 (Illumina) à la plateforme GeT-PlaGe. Les séquences ont été assemblées en utilisant le pipeline MOCAT (Kultima et al., 2012). Après élimination des séquences redondantes, un catalogue de 6,2 millions de séquences géniques a été généré. Les gènes d'antibiorésistance ont été prédits à partir de ce cat alogue sur la base de l'homologie des séquences peptidiques (BLASTx) avec la base de données ARDB (Antibiotic Resistance Database) qui contient 23137 s équences et 380 g ènes d'antibiorésistance (Liu et Pop, 2009).

1.3 Quantification par PCR

Le gène *tetO* (code une protéine qui protège le ribosome contre la tétracycline) a été quantifié par qPCR dans les conditions publiées par Zhu et al. (2013). L'abondance de *tetO* dans chaque échantillon a été normalisée en quantifiant simultanément le gène codant pour la petite sous-unité ribosomale.

1.4 Essai d'élimination des gènes d'antibiorésistance par exclusion compétitive

Les portées de 24 l apines provenant d'un même élevage utilisateur d'antibiotiques (triméthoprime / sulfamide, tilmicosine et oxytétracycline) ont été suivies de la mise-bas (J0) à J36. Les lapines "allaitantes" et les lapereaux ont été hébergés en cage individuelle dans des conditions standards. Un allaitement contrôlé a été assuré jusqu'à J17. Les portées ont été réparties en 5 lots. Dans le lot T (Témoin ; n=5) les pelotes fécales excrétées par la mère ont été laissées dans le nid. Les nids des lots NF (No Feces ; n=4), I1 (n=5), I2 (n=5) et I3 (n=5) ont été nettoyés quotidiennement et les fèces maternelles éliminées. Les lapereaux des lots I1, I2 et I3 ont été respectivement inoculés oralement avec des suspensions fécales préparées à p artir des fèces de lapines "donneuses" (D1, D2 et D3) provenant d'élevages différents non-utilisateurs d'antibiotiques et élevées dans une salle à part. Les inocula ont été préparés par homogénéisation des fèces dans du NaCl 0,9% et maintenus en condition anaérobie par une surpression de N_2. Les inoculations orales (200µL d'inoculum / lapereau) ont été réalisées 3 fois par semaine de J2 à J25. Des prélèvements de fèces des lapines "allaitantes" et "donneuses" ont été réalisés au cours de l'essai (J-13, J3, J17 et J35). Trois lapereaux par cage ont été sacrifiés à J36 pour prélever les fèces.

1.5. Analyse bactériologique de la résistance à l a tétracycline de souches d'entérobactéries sentinelles

Les fèces des lapines et lapereaux ont été homogénéisées dans de l'eau peptonée contenant 30% de glycérol et ensemencées sur milieu MacConkey. Dix souches par prélèvement ont été isolées et ensemencées sur milieu Mueller-Hilton additionné ou non de tétracycline (16 mg/L). Le pourcentage moyen d'entérobactéries résistantes à l a tétracycline (tet-R) est calculé pour chaque lapine allaitante et chaque portée de lapereaux.

1.6. Analyses statistiques

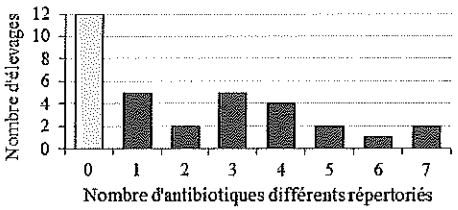
Les analyses statistiques ont été menées sous le logiciel R. Le test de Kruskal Wallis a été utilisé pour les comparaisons des moyennes, suivi d'un test de comparaison multiple (kruskalmc ou tukeyHSD).

2. Résultats et discussion

2.1. Utilisation d'antibiotiques dans le panel étudié

Le nombre de molécules différentes administrées en maternité et de façon systématique sur le pré-cheptel sur les trois dernières bandes est présenté en figure 1. 36% des élevages de ce panel n'ont pas utilisé d'antibiotique sur les 3 dernières bandes et 15% des élevages ont utilisé plus de 4 molécules antibiotiques différentes. Les deux élevages ayant utilisé le plus d'antibiotiques différents ont eu recours à 7 molécules différentes.

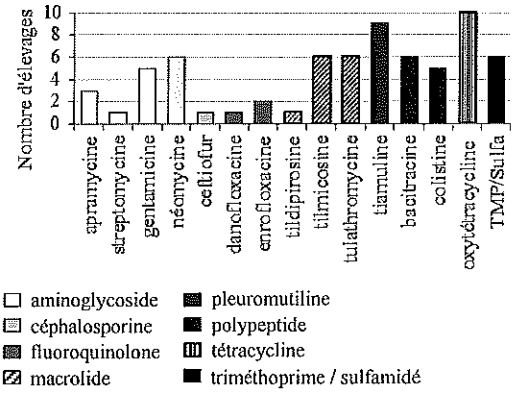
Figure 1: Nombre de molécules antibiotiques différentes utilisées dans le panel.



Tous modes d'administration confondus (Figure 2a), l'oxytétracycline est l'antibiotique le plus utilisé (30% des élevages) comme attendu d'après le suivi des ventes d'antibiotiques publié par l'ANSES (2013).

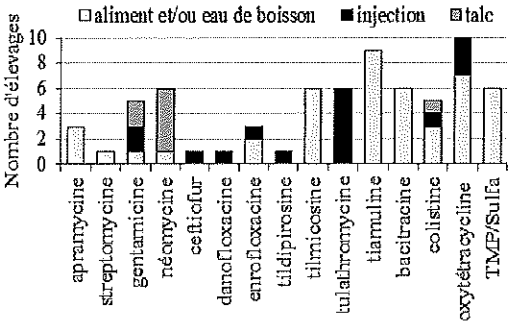
Figure 2: Antibiotiques répertoriés dans le panel

a. Tous modes d'administration confondus



aminoglycoside
céphalosporine
fluoroquinolone
macrolide
pleuromutiline
polypeptide
tétracycline
triméthoprime / sulfamidé

b. Par modes d'administration



L'essentiel des administrations d'antibiotique est réalisé par l'aliment (31%) ou par l'eau de boisson (36%; figure 2b). Le ceftiofur, la danofloxacine et l'enrofloxacine, antibiotiques dits "critiques", sont utilisés par injection (3 sur 5 traitements) et dans l'eau de boisson (enrofloxacine, dans deux élevages).

2.2. Détection de gènes d'antibiorésistance à partir d'un catalogue de 6,2M de séquences géniques

La recherche de gènes d'antibiorésistance dans le catalogue établi à partir de 30 échantillons de fèces a permis d'identifier des séquences homologues à 102 gènes connus de la base de donnée ARDB. En Figure 3, les gènes identifiés sont regroupés par antibiotique ou classe d'antibiotiques et les abondances relatives au sein des échantillons sont représentées. Parmi les dix gènes d'antibiorésistance identifiés les plus abondants (Tableau 1), sont trouvés des gènes de résistance aux tétracyclines (5 gènes), à la bacitracine, néomycine, streptomycine et aux macrolides, antibiotiques utilisés dans les élevages échantillonnés.

Tableau 1: Liste des 10 gènes d'antibiorésistance les plus représentés dans le catalogue.

Gènes	Résistance
bacA	**bacitracine**
aph(3')-IIIa	paromomycine, kanamycine, **néomycine**, ribostamycine, lividomycine, isepamicine, butirosine, amikacine, gentamincine_b
tetW	**tétracycline**
tetQ	**tétracycline**
tetO	**tétracycline**
ant(6)-Ia	**streptomycine**
ermB	streptogramin b, lincosamide, **macrolide**
tet32	**tétracycline**
tetM	**tétracycline**
cat a11	chloramphenicol

L'absence de gènes de résistance à l a tiamuline, pourtant utilisée dans 27% des élevages peut s'expliquer par l'absence de gènes de résistance dans la base ARDB.

Les gènes de résistance aux tétracyclines sont plus abondants dans les échantillons issus d'élevages consommateurs d'antibiotiques (Figure 4), et notamment lorsque les antibiotiques sont apportés par aliment (Figure 4b ; aliment suppl. vs ss Ab, $p<0,05$).

Figure 3: Abondance des gènes d'antibiorésistance identifiés par métagénomique et regroupés par phénotype de résistance.

Les antibiotiques ou classe d'antibiotiques utilisés dans les élevages du panel étudié sont repérés à l'aide d'une flèche.

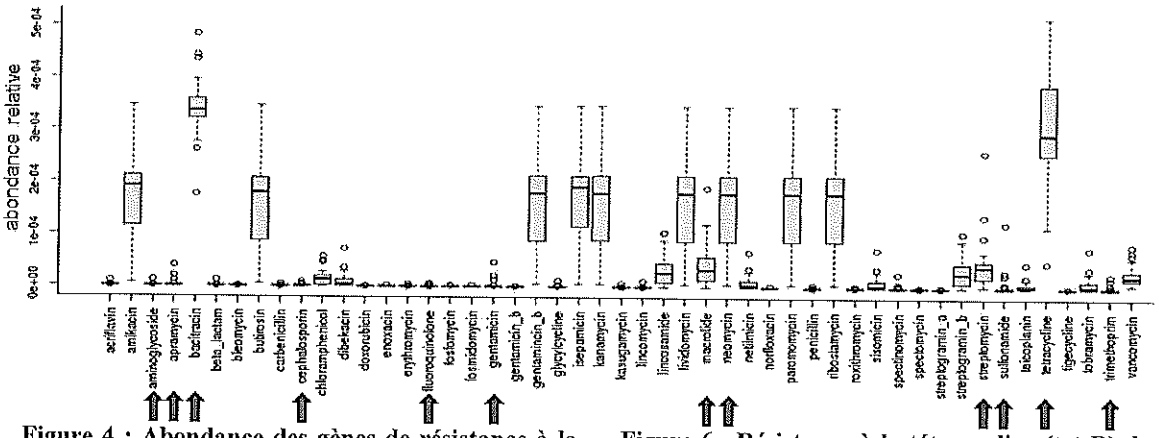
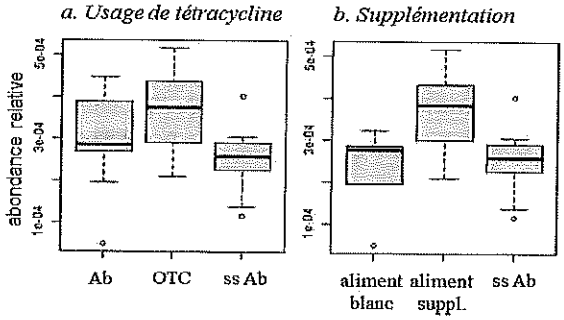


Figure 4 : Abondance des gènes de résistance à la tétracycline selon les pratiques d'antibiothérapie.

OTC : oxytétracycline ; Ab : traitement antibiotique autre que OTC, ss Ab : pas d'antibiotique, aliment suppl. : supplémentation antibiotique dans l'aliment (OTC et/ou autres)

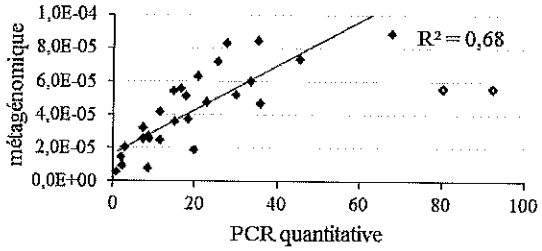


2.3. Détection du gène tetO par PCR quantitative.

Les résultats de PCR quantitative menée pour le gène *tetO*, pris comme exemple, sont cohérents avec les résultats de l'analyse métagénomique (Figure 5). Par PCR quantitative, on détecte 3 fois plus de *tetO* dans les échantillons issus d'élevages qui utilisent de la tétracycline (OTC vs ss Ab, $p<0,05$).

Figure 5: Abondance de *tetO* détecté par métagénomique et PCR quantitative.

Les 2 points gris ont été exclus pour établir la droite de régression.

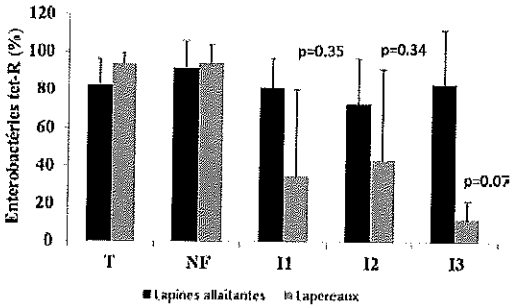


2.4. Essai d'éradication de la résistance à l a téracycline par exclusion compétitive.

Le pourcentage d'entérobactéries tet-R dans les fèces des lapines donneuses est faible (17% pour I1, < 5% pour I2 et <5% pour I3). Dans les fèces des lapines allaitantes, ce pourcentage est élevé quel que soit le lot (Min=73%, Max=92%, p=0.67 ; figure 6).

Figure 6 : Résistance à la tétracycline (tet-R) dans les fèces des lapines et des lapereaux (J36).

T (témoin, n=4) : pelotes fécales (PF) de la lapine allaitante laissées dans le nid ; NF (no feces, n=3) : retrait des PF de la lapine allaitante ; I1 (n=4), I2 (n=4) ou I3 (n=3) : retrait des PF de la lapine allaitante et inoculation des fèces de la lapine donneuse D1, D2 ou D3. Lorsque les lapines allaitantes présentent un % d'entérobactéries tet-R < 50%, la cage (mère et lapereaux) est exclue de l'analyse. Moyenne ± SD.



On retrouve un fort taux de résistance dans les fèces de lapereaux élevés en conditions standards (T, 94%). Le fait de retirer simplement les fèces de la mère allaitante n'est pas suffisant pour limiter la diffusion de l'antibiorésistance (NF, 94%). Après retrait des fèces maternelles et inoculation de suspensions fécales contenant peu de bactéries résistantes, la résistance dans les fèces des lapereaux semble diminuer par rapport au lot témoin (35%, 43% et 13% pour les portées I1, I2 et I3, respectivement), mais ces différences ne sont pas significatives (2ième bande en cours).

Conclusions

Le séquençage nous a permis de détecter 102 gènes d'antibiorésistance dans les fèces de lapins issus de 30 élevages aux pratiques d'antibiothérapie diversifiées. La PCR quantitative nous permettra de préciser la relation entre l'usage d'antibiotiques et l'abondance de gènes d'antibiorésistance stratégiques.

L'exclusion compétitive semble limiter la transmission des gènes de résistance entre la mère et ses lapereaux. Cela pourrait être pertinent et applicable en élevage en tirant profit du comportement d'ingestion de crottes naturellement présent chez les lapereaux (Combes et al., 2014).

Remerciements

Les auteurs remercient les éleveurs ainsi que tous les acteurs impliqués dans la collecte d'échantillons et la fourniture de lapines. Le personnel du plateau technique EZOP de Toxalim ainsi que les membres des équipes NED, SYSED et Toxalim sont vivement remerciés pour l'aide apportée au cours de l'essai. Ce projet est financé par l'ICSA.

Références

COMBES S., GIDENNE T., CAUQUIL L., BOUCHEZ O. FORTUN-LAMOTHE L., 2014. Coprophagous behavior of rabbit pups affects implantation of cecal microbiota and health status. *J Anim Sci,* 92, 652-665.

FORSLUND K., SUNAGAWA S., KULTIMA J.R., MENDE D.R., ARUMUGAM M., TYPAS A. BORK P., 2013. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome Res,* 23, 1163-9.

JERNBERG C., LOFMARK S., EDLUND C. JANSSON J.K., 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *Isme J,* 1, 56-66.

KULTIMA J.R., SUNAGAWA S., LI J., CHEN W., CHEN H., MENDE D.R., ARUMUGAM M., PAN Q., LIU B., QIN J., WANG J. BORK P., 2012. MOCAT: a metagenomics assembly and gene prediction toolkit. *PLoS One,* 7, e47656.

LIU B. POP M., 2009. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic acids research,* 37, D443-7.

MACH N., BERRI M., ESTELLE J., LEVENEZ F., LEMONNIER G., DENIS C., LEPLAT J.J., CHEVALEYRE C., BILLON Y., DORE J., ROGEL-GAILLARD C. LEPAGE P., 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Env Microbiol Rep,* 7, 554-569.

MUNIESA M., COLOMER-LLUCH M. JOFRE J., 2013. Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol,* 8, 739-751.

ZHU Y.G., JOHNSON T.A., SU J.Q., QIAO M., GUO G.X., STEDTFELD R.D., HASHSHAM S.A. TIEDJE J.M., 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *PNAS,* 110, 3435-40.