

Effet de l'alimentation et de l'exposition aux antibiotiques sur la quantité d'*E. coli* et la présence de bacilles Gram négatifs résistants dans le côlon des vaches laitières

A. Guillemot¹, S. Couvreur¹, L. Delaby², F. Launay³, M. Eveillard⁴

1 : Unité de Recherche sur les Systèmes d'Élevage, Université Bretagne Loire, Ecole Supérieure d'Agricultures, F-49007 Angers Cedex, France ; s.couvreur@groupe-esa.com

2 : INRA, AgroCampus Ouest, UMR Pegase, F-35590 Saint-Gilles, France

3 : INRA, Domaine Expérimental du Pin, Le Pin au Haras, F-61310 Gouffern-en-Auge, France

4 : Université Bretagne Loire – Université d'Angers - UFR Santé, F-49000 Angers, France

Introduction

L'antibiorésistance représente aujourd'hui un enjeu fort de santé publique. En Europe, l'élevage en est en partie responsable car, depuis 2012, l'administration d'antibiotiques est plus élevée pour les animaux que pour les humains (ECDPC, 2015), malgré des dispositifs de réduction des usages efficaces dans certains pays comme la France (– 37% entre 2012 et 2016 grâce au plan EcoAntibio, MAA, 2017). En élevage de vaches laitières (VL), des bactéries résistantes sont naturellement présentes mais peuvent être sélectionnées par pression de sélection *via* l'usage d'antibiotiques (PIDDOCK, 1996), en particulier dans la flore intestinale. L'apparition de souches résistantes dépend entre autres du type de molécule utilisée, de la dose et de la fréquence d'exposition (DAVID, 1970 ; LOWRENCE *et al.*, 2007). Plus l'usage d'antibiotiques est régulier, plus le risque de dissémination est fort (SATO *et al.*, 2005). Au final, les bactéries résistantes, si elles apparaissent, peuvent être transmises directement à l'homme ou diffusées dans l'environnement par le biais des fumiers et lisiers (WALCZAK et XU, 2011). L'usage des antibiotiques, même réduit, reste une source de dissémination de résistance. La recherche de facteurs en élevage pouvant la limiter est donc importante. Or, plusieurs travaux ont montré que l'alimentation permettait de moduler la composition du microbiote intestinal en jouant sur les conditions du milieu dans l'intestin, comme le pH, l'humidité, le type et l'accès au substrat (RUSSEL *et al.*, 2000). Il a ainsi été montré des effets intéressants sur la sélection de bactéries résistantes chez le bœuf à l'engraissement. ALEXANDER *et al.* (2008) montrent que le passage à une alimentation acidogène, en faisant diminuer le pH intestinal, permet la sélection de souches d'*Escherichia coli* résistantes à l'acidité, mais aussi à l'ampicilline. MIR *et al.* (2016) montrent également que, dans des élevages n'ayant jamais été exposés au céfotaxime (céphalosporine de 3^e génération, C3G), la fréquence d'apparition de résistance à cette molécule est plus élevée dans les conduites les plus intensives en termes d'alimentation et de densité animale. A ce jour, ce type de travail n'a pas été mené sur VL dans le cas d'alimentations contrastées.

Le but de cette étude, financée dans le cadre du projet ANR IDEFI Man-Imal, est donc de tester l'effet de deux régimes, se différenciant par le type de fourrage et la densité énergétique de la ration, sur la présence de bacilles à Gram négatif résistants aux C3G, bactéries qui posent le plus de problèmes thérapeutiques en médecine humaine actuellement, dans les fèces des VL, en lien avec l'exposition de long terme aux antibiotiques (trois dernières années).

Matériel et méthodes

À l'élevage expérimental du Pin-au-Haras (Orne), deux lots de VL ($n = 27$ et 30) équilibrés sur la race, l'âge, l'âge au premier vêlage et la production laitière ont été mobilisés. Un lot « Haut » reçoit un régime riche et énergétique (ensilage de maïs + concentré en hiver, herbe pâturée + 4 kg de concentré en été). Un lot « Bas » reçoit un régime à base d'herbe sans aucun concentré (ensilage en hiver, pâturage en été). Une VL, une fois intégrée dans un lot, y réalise l'intégralité de sa carrière. La conduite des vêlages est groupée avec une saison de mise-bas en hiver (janvier-février essentiellement).

Des prélèvements individuels de fèces ont été réalisés une semaine avant la mise à l'herbe et après deux mois de pâturage pour comparer l'effet des deux régimes en période hivernale et estivale. Afin d'éviter toute contamination extérieure, les prélèvements ont été réalisés directement dans le rectum à l'aide d'un gant à usage unique. Les échantillons de fèces ont été congelés à -80°C . Deux stratégies de culture ont été mises en place sur les échantillons dilués à 10^{-3} et 10^{-4} pour i) identifier et dénombrer les bactéries à Gram négatif comme la plupart des *E. coli* (géloses chromogènes UTI) et ii) sélectionner et dénombrer des souches résistantes aux C3G (milieu double Drigalski / Mac Conkey BLSE). Chaque souche isolée a été identifiée par spectrophotométrie de masse. De plus, des antibiogrammes ont été effectués sur milieu Mueller-Hinton pour chaque souche isolée sur milieu BLSE et chaque *E. coli* isolé sur milieu UTI.

L'antibiothérapie de chaque VL a été retracée sur les 3 dernières années à partir des données de suivi sanitaire du troupeau. Les informations concernant les traitements antibiotiques ont été homogénéisées en convertissant le nom commercial et les unités de dose administrées par les mg de molécule actives. Pour chaque VL, 3 périodes ont été créées par année, chacune comprenant une période de tarissement et la lactation suivante (terminée ou en cours, pour l'année 2018). Des variables synthétiques ont été créées par VL (par période et au total) : i) quantité d'antibiotique, ii) nombre de traitements et iii) quantité d'antibiotique par traitement. Les données créées (57 VL sur 3 périodes) ont permis de créer 6 groupes de VL selon leur exposition aux antibiotiques : aucune exposition (n=18), aucune exposition depuis 2016 (n=10), aucune exposition depuis 2017 (n=8), au moins une exposition en 2018 (n=5), au moins une exposition en 2017 et 2018 (n=11), primipares exposées en 2018 (n=5).

Les effets du régime et de l'antibiothérapie sur la présence et le dénombrement des bactéries ont été testés par test d'indépendance et analyse de variance, respectivement.

Résultats et discussion

Depuis 3 ans, le lot Haut est plus exposé aux antibiotiques que le lot Bas (78% vs 60% des VL traitées au moins une fois avec en moyenne 38,3 g vs 12,7 g de molécule active par VL par an). Ceci confirme que les systèmes d'élevage orientés vers l'intensification à l'échelle de l'animal sont plus consommateurs d'antibiotiques (SATO *et al.*, 2005).

En période hivernale, la proportion de vaches produisant des fèces à teneur élevée en *E. coli* est plus importante dans le lot Haut que le lot Bas (74% vs 33%, $P < 0,01$). Ceci s'accompagne par des concentrations plus élevées en *E. coli* chez les VL du lot Haut (5,0 log₁₀ vs 4,5 log₁₀, $P < 0,01$). Lors de la période estivale, à la fois la proportion et les concentrations deviennent comparables entre stratégies alimentaires (28% et 4,3 log₁₀ pour le lot Haut et 56% et 4,4 log₁₀ pour le lot Bas). Ainsi, en accord avec ALEXANDER *et al.* (2008), une alimentation dense en énergie, en situation de confinement des animaux, en modifiant les conditions de milieu et de substrat dans l'intestin, a pu favoriser le développement de souches d'*E. coli*.

Malgré cela, seules deux souches d'*Ochrobactrum anthropi*, une souche d'*Acinetobacter lwoffii* et une souche d'*E. coli* résistantes aux C3G ont été trouvées sans aucun lien avec les régimes alimentaires ou l'antibiothérapie. Ceci pourrait entre autres s'expliquer par le fait que les molécules couramment utilisées dans les antibiothérapies n'étaient pas celles pour lesquelles nous recherchions une résistance ou exerçaient une faible pression de sélection sur les bacilles à Gram négatif résistants aux C3G.

Conclusion

Des conditions d'alimentation favorisant le potentiel de production des animaux pourraient induire des situations favorables à l'apparition de bactéries résistantes en : i) augmentant la pression de sélection par un usage accru d'antibiotiques et ii) augmentant la fréquence et la quantité de bactéries sensibles. Malgré cela, l'apparition n'est pas systématique et doit être confirmée par un travail sur un plus grand nombre d'animaux.

Références bibliographiques

- ALEXANDER T.W., YANKE L.J., TOPP E., OLSON M.E., READ R.R., MORCK D.W., MCALLISTER T.A. (2008) : Effect of Subtherapeutic Administration of Antibiotics on the Prevalence of Antibiotic-Resistant Escherichia coli Bacteria in Feedlot Cattle. *Appl. Env. Microbiol.*, 74, 4405-4416.
- DAVID H.L. (1970) : Probability Distribution of Drug-Resistant Mutants in Unselected Populations of Mycobacterium tuberculosis. *Appl. Microbiol.*, 20, 810-814.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDPC) (2015) : ECDPC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. *EFSA J.*, 13, 114.
- LOWRANCE T.C., LONERAGAN G.H., KUNZE D.J., PLATT T.M., IVES S.E., SCOTT H.M., NORBY B., ECHEVERRY A., BRASHEARS M.M. (2007) : Changes in antimicrobial susceptibility in a population of Escherichia coli isolated from feedlot cattle administered ceftiofur crystalline-free acid. *Am. J. Vet. Res.*, 68, 501-507.
- MAA (2017) : Plan EcoAntibio - Communiqué de presse.
- MIR R.A., WEPPELMANN T.A., JOHNSON J.A., ARCHER D., JEONG K.C. (2016) : Identification and Characterization of Cefotaxime Resistant Bacteria in Beef Cattle. *PLOS ONE*, 11, e0163279.
- PIDDOCK L.J. (1996) : Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J. Antimicrob. Chemother.*, 38, 1-3.
- RUSSEL J. B., DIEZ-GONZALEZ F., JARVIS G.N. (2000) : Invited Review : Effects of Diet Shifts on Escherichia coli in Cattle. *J. Dairy Sci.*, 83, 863-873.
- SATO K., BARTLETT P.C., SAEED M.A. (2005) : Antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 226, 589-594.
- WALCZAK J.J. ET XU S. (2011) : Manure as a Source of Antibiotic-Resistant Escherichia coli and Enterococci : a Case Study of a Wisconsin, USA Family Dairy Farm. *Water, Air, & Soil Pollution*, 219, 579-589.