

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

ÉVALUATION DE L'IMPACT DE L'UTILISATION DE TYLOSINE ET DE  
VIRGINIAMYCINE SUR LES PROFILS DE RÉSISTANCE AUX  
ANTIMICROBIENS CHEZ *ENTEROCOCCUS* SP. ET *ESCHERICHIA COLI*  
ISOLÉS DE PORCS

par

ULYSSE DESRANLEAU DANDURAND

Département de Pathologie et Microbiologie

Faculté de Médecine Vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du  
grade

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Novembre 2008

©Ulysse Desranleau Dandurand 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

**ÉVALUATION DE L'IMPACT DE L'UTILISATION DE TYLOSINE ET DE  
VIRGINIAMYCINE SUR LES PROFILS DE RÉSISTANCE AUX  
ANTIMICROBIENS CHEZ *ENTEROCOCCUS* SP. ET *ESCHERICHIA COLI*  
ISOLÉS DE PORCS**

présenté par

ULYSSE DESRANLEAU DANDURAND

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Serge Messier, président-rapporteur

Ann Letellier, directrice de recherche

Sylvain Quessy, codirecteur

Edward Topp, codirecteur

Marie Archambault, membre du jury



## Résumé

Les antibiotiques sont utilisés depuis longtemps comme additifs alimentaires en médecine vétérinaire. Des événements récents soulèvent des interrogations quant au rôle de ces additifs dans la hausse de la résistance antimicrobienne observée chez certains agents pathogènes. L'objectif de cette étude était l'évaluation de l'impact de l'utilisation de deux promoteurs de croissance, la tylosine et la virginiamycine, sur les profils de résistance de *Escherichia coli* et *Enterococcus* sp. et sur les performances zootechniques chez le porc. Deux expériences consécutives ont été menées dans une ferme d'engraissement au Québec. Pour chaque essai, 300 porcs provenant de la même pouponnière ont été séparés en trois groupes, chaque groupe recevant l'une des trois diètes suivantes pendant 15 semaines: sans agent antimicrobien, virginiamycine à 22 ppm ou tylosine à 44 ppm. *E. coli* and *Enterococcus* sp. ont été isolés de fèces animales puis analysés pour la résistance envers plusieurs antibiotiques. Aucune différence significative entre les groupes recevant des antibiotiques et le groupe témoin n'a été détectée dans la conversion alimentaire, le taux de mortalité et le taux de maladie. Les isolats d'*E. coli* de la 15<sup>e</sup> semaine étaient résistants à un nombre plus élevé d'antibiotiques dans les groupes ayant reçu des promoteurs de croissance, alors que les profils d'*Enterococcus* sp. ont été modifiés dans tous les groupes, sans toutefois être résistants à plus d'antibiotiques. Nous avons observé une résistance élevée aux promoteurs de croissance tylosine et virginiamycine chez les *Enterococcus* sp. de tous les groupes dès la première semaine. Les résultats obtenus indiquent que, dans ces conditions expérimentales, les promoteurs de croissance utilisés n'améliorent pas les performances zootechniques chez les porcs mais contribuent à modifier les profils de résistances aux antimicrobiens de *E. coli* et *Enterococcus* sp.

Mots clés : résistance aux antibiotiques, porc, promoteurs de croissance virginiamycine, tylosine, *E. coli*, *Enterococcus*.

## Abstract

Antibiotics have long been used in veterinary medicine as feed additives. Recent events have raised questions about the possibility that these additives may contribute to or be responsible for the increase in antimicrobial resistance seen in some pathogens. The objective of this study was to evaluate the impact of the use of tylosin and virginiamycin on the resistance profiles of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. as well as to evaluate their effect on feed efficiency. Two consecutive trials were conducted in a finishing unit in Québec. In each trial, 300 pigs originating from the same nursery were separated into three groups, each group receiving one of three specific diets during 15 weeks : feed with either no additives, 22 ppm virginiamycin or 44 ppm tylosin. *E. coli* and *Enterococcus* sp. were isolated from animal feces and then tested for antimicrobial resistance towards several antibiotics. There was no significant difference in feed efficiency between groups receiving growth promoters and the control group. Mortality and disease rates were also similar. *E. coli* isolates from the fifteenth week were resistant to more antibiotics in groups receiving a diet supplemented with antibiotics whereas, while antimicrobial resistance patterns changed in all groups, no overall increase in the number of resistance was noted in *Enterococcus* sp. isolates. *Enterococcus* sp. from all groups were resistant to the antibiotics used in the trial from the start. Under these experimental conditions, our results suggest that tylosin and virginiamycin do not improve feed efficiency in swine production; however, they do contribute to the modification of the antimicrobial resistance profiles of *E. coli* and *Enterococcus* sp.

Key words: antimicrobial resistance, swine, growth promoters. tylosin, virginiamycin, *E. coli*, *Enterococcus*.

## Table des matières

Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des des abréviations.....	viii
Introduction.....	9
1 Recension de la littérature.....	12
1.1 L'utilisation des promoteurs de croissance .....	12
1.1.1 Retrait des promoteurs de croissance en Europe .....	12
1.2 L'utilisation d'antibiotiques .....	13
1.2.1 Usage thérapeutique .....	13
1.2.2 Métaphylaxie .....	14
1.2.3 Prophylaxie.....	14
1.2.4 Promotion de la croissance .....	15
1.3 Principaux promoteurs de croissance utilisés au Canada.....	18
1.3.1 Tylosine. ....	18
1.3.2 Virginiamycine .....	20
1.4 Résistance aux antibiotiques. ....	22
1.4.1 Pharmacodynamique .....	22
1.4.2 Causes de la résistance .....	24
1.4.3 Conséquences de la résistance .....	25
1.4.4 Résistance et promoteurs de croissance .....	27
1.4.5 Transmission de la résistance des animaux aux humains et acquisition de bactéries résistantes.....	28
1.4.6 Mécanismes de transfert des gènes de résistance .....	28
1.5 Microorganismes à l'étude .....	29
1.5.1 <i>Enterococcus</i> sp. ....	30
1.5.2 <i>Escherichia coli</i> .....	34
2 Article scientifique .....	38
3 Discussion générale des résultats. ....	57
3.1 Performances zootechniques. ....	57
3.1.1 Efficacité alimentaire .....	57
3.1.2 Maladie et mortalité .....	59
3.1.3 Limitations statistiques.....	60
3.2 Résistance phénotypique.....	61
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	61
3.2.2 <i>Enterococcus</i> .....	68
3.3 Concentrations minimales inhibitrices des promoteurs de croissance.....	77
4 Conclusions.....	78
5 Références.....	79
6 Annexes .....	101
Annexe 1 : Résultats de PCR .....	101

## Liste des tableaux

Tableau I : Résumé des résistances d' <i>Enterococcus</i> sp.....	p.34
Tableau II : Résumé des résistances d' <i>E. coli</i> aux streptogramines et aux macrolides.....	p.37
Tableau III: Nombre d'isolats d' <i>Enterococcus</i> provenant du deuxième essai de l'étude dans lesquels on détecte le gène <i>vatD</i> par PCR.....	p.101
Article	
Table I: Feed efficiency of all groups during both trials in kg gained per kg of feed consumed.....	p.44
Table II: Numbers of deaths (D) and withdrawals (W) of pigs in all groups during both trials.....	p.44
Table III: Significant ( $p < 0.05$ )* changes between Week 1 and Week 15 in the percentage of isolates of <i>E. coli</i> resistant to antimicrobial agents for each diet.....	p.46
Table IV: Significant ( $p < 0.05$ )* changes between Week 1 and Week 15 in the percentage of isolates of <i>Enterococcus</i> sp. resistant to antimicrobial agents for each diet.....	p.47
Table V: Percentages of serotypes in <i>E. coli</i> isolates of trial 2.....	p.48

## Liste des figures

Figure 1 : Mode d'action des macrolides.....	p.20
Figure 2 : Mode d'action de la virginiamycine.....	p.22
Figure 3 : Principe d'air sous la courbe en pharmacodynamique.....	p.23
Figure 4 : Résultats de PCR du gène <i>vatD</i> chez les <i>Enterococcus</i> du groupe VG à la semaine 1.....	p.101

## Article

Figure 1 : MIC for tylosin in <i>Enterococcus</i> isolates.....	p.45
Figure 2 : MIC for virginiamycin in <i>Enterococcus</i> isolates.....	p.45

## Liste des sigles et abréviations

- ADN : acide déoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ARNt : acide ribonucléique de transfert  
ATB : antibiotique  
© : copyright  
CÉE : communauté des états européens  
CMI : concentration minimale inhibitrice  
*E. coli* : *Escherichia coli*  
*E. faecalis* : *Enterococcus faecalis*  
*E. faecium* : *Enterococcus faecium*  
ERV : *Enterococcus* résistant à la vancomycine  
g : gramme  
IgA : Immunoglobuline A  
mL : millilitres  
ppm : parties par million  
GP : growth promoter (promoteur de croissance)  
OMC : Organisation mondiale du commerce  
PC : promoteurs de croissance  
PFGE : Électrophorèse en gel à champ pulsé  
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline  
UFC : unités formant des colonies  
µg : microgramme  
µL : microlitre  
VG : virginiamycine  
Wk : week (semaine)

*«The trouble with being a hypochondriac these days is that antibiotics have cured all the good diseases».* -Caskie Stinnett

## **Introduction**

L'industrie agricole est, dans la plupart des pays, une des industries les plus importantes. Avec la montée du commerce international, les entreprises ne sont plus simplement soumises à la concurrence régionale et nationale, mais bel et bien confrontées à l'ensemble des entreprises oeuvrant dans le même secteur à travers le monde. Dans les régions développées, comme le Québec, le coût de la main d'oeuvre défavorise les entreprises locales. Dans ces conditions, et avec les volumes importants reliés à l'agriculture industrielle, le moindre pourcentage d'amélioration représente des économies substantielles, et une compétitivité accrue.

Une des façons d'améliorer la rentabilité des élevages agricoles, comme les élevages porcins, est l'utilisation d'antibiotiques (ATB). Il est ainsi possible de traiter les individus atteints d'une maladie particulière ou encore de soumettre un troupeau à un traitement antibiotique préventif si on le sait vulnérable à une infection microbienne ; ces deux pratiques sont semblables à ce qui se fait en médecine humaine. On peut aussi utiliser les antibiotiques comme promoteurs de croissances (PC) (Dibner et Richards 2005). Les PC antimicrobiens sont des antibiotiques administrés aux animaux via leur alimentation, à des doses sous-thérapeutiques. Cela peut être au moment du sevrage (Wierup 2001), ou alors durant leur croissance (Dewey, Cox, Straw *et al.* 1997). Leur fonction est essentiellement économique : ils servent à améliorer le rendement des élevages, et auraient des effets multiples, notamment une amélioration du gain de poids et une meilleure santé globale des troupeaux (Stokstad, Jukes et Pierce 1949).

Malheureusement, une utilisation répétée d'un même antibiotique à petites doses peut avoir des conséquences sur le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques. Avec le temps, la population bactérienne (exposée à l'antibiotique dans le système digestif des animaux) devient de plus en plus résistante, les bactéries ne possédant pas les gènes de résistance requis

ayant plus de chances d'être éliminées à chaque traitement (DuPont et Steele 1987). Si les gènes de résistance sont transférables, il se peut aussi que la résistance se propage à plusieurs espèces microbiennes (Porter 1988). On se trouve alors dans une situation où les bactéries causant une maladie sont devenues résistantes à l'antibiotique supposé les éliminer, cela rend donc le traitement plus difficile. Ces bactéries résistantes représentent aussi un risque pour la santé des travailleurs entrant en contact avec les animaux porteurs en élevage, ainsi que pour les consommateurs dans le cas d'une contamination de la viande par un agent responsable de toxi-infections alimentaires (Lester, Frimodt-Moller et al. 2006).

En médecine humaine, on voit de plus en plus de cas de résistance aux antibiotiques répertoriés dans les hôpitaux, comme le SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) (Klevens, Morrison, Nadle *et al.* 2007) et le ERV (*Enterococcus* Résistant à la Vancomycine) (NNIS 2000). Il faut dans ces cas se tourner vers des antibiotiques différents qui peuvent avoir des effets secondaires ou des contre-indications qui limitent leur portée. Les mesures devant être prises pour éliminer les bactéries résistantes des établissements de santé sont draconiennes et très coûteuses, on souhaite donc éviter le plus possible ce phénomène.

Bien que l'antibiorésistance observée chez les microorganismes isolés d'humains soit attribuable à l'utilisation d'antibiotiques en médecine (Kirst, Thompson et Nicas 1998; Fridkin, Edwards, Pichette *et al.* 1999), leur usage en production animale (particulièrement de façon soutenue et à des doses hors normes ou hors étiquettes, comme c'est le cas pour les PC dans les élevages commerciaux) soulève des interrogations vis-à-vis l'émergence de la résistance dans ce contexte. On pourrait s'attendre à ce que des souches bactériennes résistantes apparaissent dans ces conditions, et créent ainsi un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques dans la population bactérienne de ces élevages.

Il faut par contre se rappeler que des conditions d'élevage commerciales diffèrent des conditions contrôlées, comme celles d'un laboratoire ou d'essais cliniques portant sur quelques individus. On ne peut donc pas présumer que les

effets de l'utilisation de PC sur une population microbienne présente en élevage seront les mêmes que ceux obtenus dans des conditions contrôlées.

Notre étude avait comme hypothèse que l'utilisation de PC en élevage provoque l'apparition d'un réservoir de souches ayant une résistance à certains antibiotiques, créant ainsi un réservoir de gènes de résistance dans la population microbienne.

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer, en condition terrain, l'impact des promoteurs de croissance nommés, tylosine et virginiamycine, sur les profils de résistance aux antibiotiques de *Escherichia coli* et *Enterococcus* sp. isolés de matières fécales porcs. Ces microorganismes indicateurs ont été isolés de fèces prélevées dans l'environnement des animaux au début et à la fin d'une période d'engraissement de 15 semaines, et nous avons analysé leurs profils de résistance afin de pouvoir comparer les pourcentages de résistance à des antibiotiques donnés avant et après le traitement avec des PC. De façon complémentaire, nous avons aussi analysé le gain de poids ainsi que les taux de maladie et de mortalité des porcs recevant ces traitements.

*«The trouble with being a hypochondriac these days is that antibiotics have cured all the good diseases».* -Caskie Stinnett

## **Introduction**

L'industrie agricole est, dans la plupart des pays, une des industries les plus importantes. Avec la montée du commerce international, les entreprises ne sont plus simplement soumises à la concurrence régionale et nationale, mais bel et bien confrontées à l'ensemble des entreprises oeuvrant dans le même secteur à travers le monde. Dans les régions développées, comme le Québec, le coût de la main d'oeuvre défavorise les entreprises locales. Dans ces conditions, et avec les volumes importants reliés à l'agriculture industrielle, le moindre pourcentage d'amélioration représente des économies substantielles, et une compétitivité accrue.

Une des façons d'améliorer la rentabilité des élevages agricoles, comme les élevages porcins, est l'utilisation d'antibiotiques (ATB). Il est ainsi possible de traiter les individus atteints d'une maladie particulière ou encore de soumettre un troupeau à un traitement antibiotique préventif si on le sait vulnérable à une infection microbienne ; ces deux pratiques sont semblables à ce qui se fait en médecine humaine. On peut aussi utiliser les antibiotiques comme promoteurs de croissances (PC) (Dibner et Richards 2005). Les PC antimicrobiens sont des antibiotiques administrés aux animaux via leur alimentation, à des doses sous-thérapeutiques. Cela peut être au moment du sevrage (Wierup 2001), ou alors durant leur croissance (Dewey, Cox, Straw *et al.* 1997). Leur fonction est essentiellement économique : ils servent à améliorer le rendement des élevages, et auraient des effets multiples, notamment une amélioration du gain de poids et une meilleure santé globale des troupeaux (Stokstad, Jukes et Pierce 1949).

Malheureusement, une utilisation répétée d'un même antibiotique à petites doses peut avoir des conséquences sur le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques. Avec le temps, la population bactérienne (exposée à l'antibiotique dans le système digestif des animaux) devient de plus en plus résistante, les bactéries ne possédant pas les gènes de résistance requis

médecine humaine, a longtemps été utilisée comme PC, entre autres chez la volaille et les porcs, chez les et a été associée à l'émergence de la résistance à la vancomycine chez *Enterococcus* (Bager, Madsen, Christensen *et al.* 1997). L'Union Européenne a finalement banni 4 autres PC en 1999 soit la tylosine, la virginiamycine, la spiramycine et la bacitracine (CÉE 1999; Casewell, Friis, Marco *et al.* 2003).

Depuis, des études ont tenté de démontrer la corrélation entre l'utilisation des PC et la résistance aux ATB (Aarestrup, Bager, Jensen *et al.* 1998). L'équipe d'Aarestrup (1998), a trouvé que la résistance à l'érythromycine était 2,4 fois plus présente chez les *Enterococcus* isolés de porcs recevant de la tylosine, un antibiotique de la classe des macrolides, comme l'érythromycine. Après quelques années, certains prétendent que l'impact de cette interdiction est néfaste supposant un usage accru des ATB thérapeutiques (Cervantes 2004; Phillips 2007), d'autres chercheurs sont moins certains (Angulo, Nargund et Chiller 2004; Collignon 2004). Wierup (2001) avance que la production de porcelets en Suède a effectivement eu recours à une quantité accrue d'antibiotiques en thérapie après le retrait des PC dans ce pays en 1986, mais que des ajustements dans la gestion de la production ont permis de réduire ces quantités par la suite.

## 1.2 L'utilisation d'antibiotiques

### 1.2.1 Usage thérapeutique

Il est important de faire la distinction entre les différentes utilisations des antibiotiques. Traditionnellement, les antibiotiques ont été utilisés afin de guérir ou ralentir une infection déjà symptomatique chez un individu. C'est ce qu'on appelle l'usage thérapeutique, qui est l'approche la plus fréquente chez les humains. Chez les animaux, cet usage est beaucoup moins répandu, vu l'ampleur des productions. L'usage thérapeutique est courant chez les bovins (McDougall, Agnew, Cursons *et al.* 2007), où la valeur individuelle de l'animal peut rendre rentable l'utilisation d'antibiotiques. Cette approche individuelle est peu

pratique dans la volaille, où le simple coût de la main d'oeuvre requise pour traiter l'animal rendrait déjà l'opération déficitaire vu la faible valeur économique de ce dernier. Dans le cas des porcs, il arrive que l'on traite des animaux individuellement (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Par exemple, la tylosine peut être injectée individuellement à des porcs pour traiter des pneumonies (Couper, Cromie, Neeve *et al.* 2006). Les traitements sont administrés dans les aliments ou l'eau (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004) ou par injection, et la dose donnée est bien supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui est la concentration minimale théorique d'antibiotique à laquelle la croissance des microorganismes ciblés est inhibée. La particularité de l'approche thérapeutique est le fait qu'il s'agit généralement de cas par cas, avec un traitement approprié à l'individu; les autres approches, décrites dans les sections suivantes, font plus souvent appel à un traitement de groupe. Le problème du traitement thérapeutique de groupe est que l'on doit distribuer les antibiotiques dans la nourriture ou l'eau, mais qu'il arrive souvent que les animaux malades ne mangent pas et ne boivent pas, et on ne peut donc pas s'assurer qu'une dose suffisante est ingérée. Cette pratique peut entraîner une sélection de bactéries résistantes à cet ATB (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004).

### **1.2.2 Métaphylaxie**

La métaphylaxie consiste à traiter un groupe entier d'animaux lorsque seulement quelques individus sont malades mais que l'on s'attend à ce que le reste d'entre eux développent aussi les symptômes (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Comme avec l'approche thérapeutique, on procède à une évaluation des signes cliniques et on choisit un agent antimicrobien approprié.

### **1.2.3 Prophylaxie**

Dans le cas de la prophylaxie, il s'agit plutôt d'une mesure préventive. On administre les antibiotiques au groupe, souvent par la moulée ou l'eau, lorsque les animaux ne sont pas malades mais sont dans une situation où on s'attend, par expérience, à ce qu'ils le deviennent (Phillips, Casewell, Cox *et al.*

2004). On peut, par exemple, aussi utiliser la prophylaxie avant une opération; chez les grands animaux, (McDougall, Agnew, Cursons *et al.* 2007) ou juste avant la naissance (Croft, Duffield, Menzies *et al.* 2000). Cette approche est critiquée car il s'agit d'une pratique pouvant favoriser la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques, la concentration utilisée étant souvent inférieure à la CMI (Tenover 2001).

#### **1.2.4 Promotion de la croissance**

Puis, il y a l'utilisation d'antibiotiques comme PC, i.e. l'administration d'ATB en faible concentration et en continu dans l'alimentation des animaux. Les PC sont des molécules agissant de façon à améliorer la croissance d'un organisme par divers mécanismes. Tous les PC ne sont pas des antibiotiques : on retrouve aussi, entre autres, des hormones, qui stimulent la croissance pour que l'animal prenne du poids plus rapidement (Heitzman 1979) et des acides gras, comme les acides linoléiques conjugués qui modifient la composition et le nombre de cellules composant le système immunitaire chez les porcelets (Weber, Schinckel, Houseknecht *et al.* 2001).

Pour ce qui est des PC antimicrobiens, dont on a découvert les propriétés au milieu du siècle dernier (Stokstad, Jukes et Pierce 1949), les mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Il existe cependant des théories expliquant leurs effets bénéfiques sur la productivité des élevages.

##### **1.2.4.1 Effets et mécanismes d'actions des promoteurs de croissance**

###### **Réduction de la masse microbienne**

Tout d'abord, un PC antimicrobien ralentit la croissance microbienne lors des infections sous-cliniques, ce qui diminue la réponse du système immunitaire. Un système immunitaire moins sollicité ne monopolise plus autant d'énergie, et cette énergie peut alors être utilisée pour la croissance de l'animal (Van Lunen 2003; Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Un porc normal adulte

produit plusieurs grammes d'immunoglobuline A (IgA) par jour (Dibner et Richards 2005). Même si la flore commensale de ces animaux induit tout de même une certaine production d'IgA, la réduction de leur production entraîne toute de même une dépense énergétique moindre. De plus, il a été proposé que la masse microbienne totale est réduite dans le tractus gastro-intestinal des animaux, tout comme les nombres d'espèces présentes (Close 2000; Gaskins, Collier et Anderson 2002; Collier, Smiricky-Tjardes, Albin *et al.* 2003).

### **Modification des espèces de la flore microbienne**

Un autre des effets bénéfiques postulés est la modification de la distribution des espèces bactériennes dans la flore microbienne. Un paramètre important de l'alimentation des animaux de consommation est l'indice de conversion, qui donne le ratio nourriture consommée /kg d'animal produit (os, gras, viande). L'ingestion de nourriture supplémentée de promoteurs de croissance a pour effet de modifier la flore microbienne des intestins, inhibant certaines bactéries pathogènes et favorisant la colonisation par des microorganismes commensaux, par exemple les lactobacilles (Collier, Smiricky-Tjardes, Albin *et al.* 2003). Les bactéries commensales compétitionnent ensuite avec les agents pathogènes, ce qui peut entraîner une réduction de la production de certains métabolites nuisant à la croissance des animaux et, par conséquent, une réduction des nutriments consommés par les agents pathogènes (Collier, Smiricky-Tjardes, Albin *et al.* 2003). Les bactéries commensales produisent aussi des vitamines et des facteurs de croissance (Kelly et King 2001) et peuvent rendre plus accessibles certains sucres complexes. Ces deux effets se traduisent par une augmentation de l'indice de conversion alimentaire, rendant ainsi plus rentable la production puisque moins de moulée est nécessaire pour atteindre le poids voulu.

### **Hausse de l'absorption des nutriments**

Un autre effet positif attribué aux PC antimicrobiens est la meilleure digestion de la nourriture via une hausse de l'absorption des nutriments. En effet, comme les agents pathogènes sont moins présents, la membrane intestinale

est moins inflammée et il y a une baisse de la sécrétion de mucus (Gaskins 2001). Le mucus agit comme une barrière entre les agents pathogènes et la membrane intestinale, mais sa production entraîne une perte énergétique pour l'animal (Dibner et Richards 2005). La présence réduite des agents pathogènes entraîne aussi une baisse de la production des cellules épithéliales de l'intestin, ce qui se traduit par un gain énergétique (Dibner et Richards 2005). On note aussi un amincissement des villosités intestinales à cause de l'absence de certains métabolites produits lors de la fermentation microbienne (Frankel, Zhang, Singh *et al.* 1994). L'amincissement de la membrane et des villosités résulte en une meilleure absorption de nutriments nécessaires à la croissance.

### **Prévention des maladies**

Il est aussi documenté que les PC antimicrobiens ont une action résolument préventive contre les maladies, puisque, suivant le bannissement des promoteurs de croissance en Europe, au Danemark, la quantité nette d'antibiotiques utilisés pour fin de traitement a augmenté substantiellement (Muirhead 2002) et une hausse de l'incidence de certaines maladies a été constatée (Wegener 2002; Casewell, Friis, Marco *et al.* 2003), notamment chez les jeunes porcelets. Une autre étude mentionne une hausse de la prévalence de la diarrhée, souvent due à *Lawsonia intercellularis*, et une hausse de 0,6 à 1,5% de la mortalité (Jensen 2006). Wierup (2001) aussi rapporte que, suivant la banissement des PC en Suède, des problèmes cliniques sont apparus chez les porcelets, et que jusqu'à 75% des porcs ont été traités (en thérapie) avec des ATB. La quantité totale d'ATB utilisée dans ce pays aurait augmenté pendant 4 ans après l'interdiction (Wierup 2001). Selon Bengtsson et Wierup (2006), la hausse du coût de production d'un porc due au retrait se chiffre à 1€.

#### **1.2.4.2 Limitations des promoteurs de croissance.**

Il existe cependant des études où les PC ne semblent pas avoir favorisé le gain de poids chez les porcs en finition (Dritz, Tokach, Goodband *et al.* 2002; Van Lunen 2003). On présente d'ailleurs un intéressant paradoxe : si les PC

aident effectivement à libérer le système immunitaire du fardeau des bactéries pathogènes, un effet bénéfique sera donc plus souvent observé lorsque la maladie est présente en élevage ou lorsque que les mesures de biosécurité sont déficientes (Van Lunen 2003), car ces conditions favorisent une exposition des animaux aux agents pathogènes. Dans une étude canadienne, on a analysé la performance de porcs nourris avec ou sans tylosine dans des conditions de biosécurité très strictes (Van Lunen 2003). Le design expérimental de cette étude a rendu difficile l'évaluation de la conversion alimentaire, mais Van Lunen note tout de même qu'elle a semblé similaire entre le groupe témoin et le groupe ayant reçu de la tylosine. Van Lunen (2003) a conclu que la biosécurité rend l'utilisation de tylosine comme additif dans la moulée non nécessaire. D'ailleurs, Wierup (2001) rapporte aussi que, suite à des ajustements dans la gestion des troupeaux en Suède, la quantité d'ATB utilisée dans ce pays est revenue à la baisse après avoir augmenté pendant 4 ans suivant le banissement des PC dans ce pays. Une autre étude (Grave, Jensen, Odensvik *et al.* 2006) rapporte qu'en Suède, on utilisait en 2003 16 tonnes d'ATB en production animale, comparativement à 51 tonnes en 1984. Une autre étude rapporte aussi des baisses des quantités totales d'ATB utilisées en production animale (Bengtsson et Wierup 2006). Bengtsson et Wierup (2006) rapportent des réductions en Suède (réduction de 65%), au Danemark (47% de réduction) et en Norvège (40% de réduction) suivant le banissement des PC dans ces pays.

### **1.3 Principaux promoteurs de croissance utilisés au Canada.**

Plusieurs promoteurs de croissance sont utilisés au Canada. Chez l'espèce porcine, les promoteurs les plus souvent utilisés sont la tylosine et la virginiamycine.

#### **1.3.1 Tylosine.**

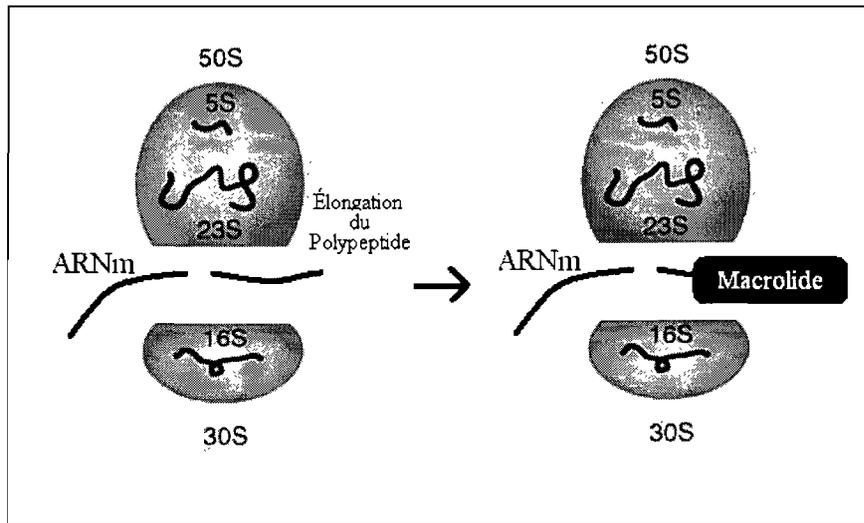
La tylosine est un antibiotique de la classe des macrolides. Sa production est assurée par *Streptomyces fradiae* (Cundliffe, Bate, Butler *et al.* 2001). L'usage de la tylosine est approuvé au Canada depuis plus de 40 ans (Santé-

Canada 2007), mais est interdit, en tant que PC, dans la Communauté des États Européens (CÉE) depuis son banissement (CÉE 1999). La tylosine n'est pas seulement utilisée comme PC, mais aussi en prophylaxie, par exemple pour prévenir les abcès hépatiques chez les bovins (Nagaraja, Sun, Wallace *et al.* 1999), et en thérapie, notamment chez les porcs pour traiter les pneumonies (Couper, Cromie, Neeve *et al.* 2006). L'action de la tylosine est plus particulièrement dirigée vers les bactéries à Gram positif.

### 1.3.1.1 Mode d'action

Le mode d'action de la tylosine est semblable à celui des autres macrolides, et est illustré à la Figure 1. La cible est le ribosome bactérien (sous-unité 23S). En se liant au ribosome, au nucléotide A2058, la tylosine interfère avec la synthèse protéique. En effet, la présence de la molécule dans le canal où se forme le polypeptide empêche l'élongation de ce dernier, et empêche donc la formation de nouvelles protéines. Avec quelques variations, les autres macrolides se lient tous à peu près au même site ribosomal que la tylosine. Par contre, ils possèdent tous certaines particularités, comme par exemple, le nombre de carbones sur leur anneau macrolactone et la disposition des sucres autour de cet anneau. Ces différences amènent des arrangements stériques différents à l'intérieur du canal (Liu et Douthwaite 2002). Il est à noter que *Streptomyces fradiae*, le microorganisme produisant la tylosine, possède lui-même des gènes de résistance contre son propre produit : *tlrA*, *tlrB*, *tlrC* et *tlrD* (Cundliffe, Bate, Butler *et al.* 2001). TlrA et TlrD sont des méthyltransférases de la même famille que les Erm qui sont, elles, retrouvées principalement, chez les bactéries à Gram positif (Liu et Douthwaite 2002). TlrB est également une méthyltransférase (Liu, Kirpekar, Van Wezel *et al.* 2000). Ces trois méthyltransférases transfèrent un groupement méthyl sur l'ARNr (sous-unité 23S), ce qui protège *Streptomyces fradiae* de l'action de la tylosine. TlrA et TlrD s'attachent au nucléotide A2058 du ribosome, alors que TlrB s'attache au nucléotide G748. TlrC est une pompe à efflux qui expulse le produit hors de la bactérie, ce qui confère une résistance modérée à la tylosine (Ouellette, Legare et Papadopoulou 1994).

**Figure 1 : Mode d'action des macrolides**



La pertinence de l'usage de la tylosine en production animale est remise en question car, comme il s'agit d'un antibiotique de la classe des macrolides, elle est donc dans la même classe que l'érythromycine, un autre macrolide. Les macrolides ont un spectre d'action qui comprend plusieurs coques à Gram positif ainsi que *Neisseria*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori* (C.B.I.P. 2008). Les macrolides sont utilisés régulièrement en médecine humaine pour traiter des infections cutanées causées par des bactéries coques à Gram positif, mais aussi des infections des voies respiratoire, comme la pneumonie causée par *Legionella pneumophila*, une bactérie à Gram négatif (Baltch, Bopp, Smith *et al.* 2005). Il est donc possible que des bactéries résistantes à la tylosine deviennent également résistantes à l'érythromycine, et à d'autres macrolides, par le même mécanisme de résistance, et compliquent ainsi le traitement de certaines maladies.

### 1.3.2 Virginiamycine

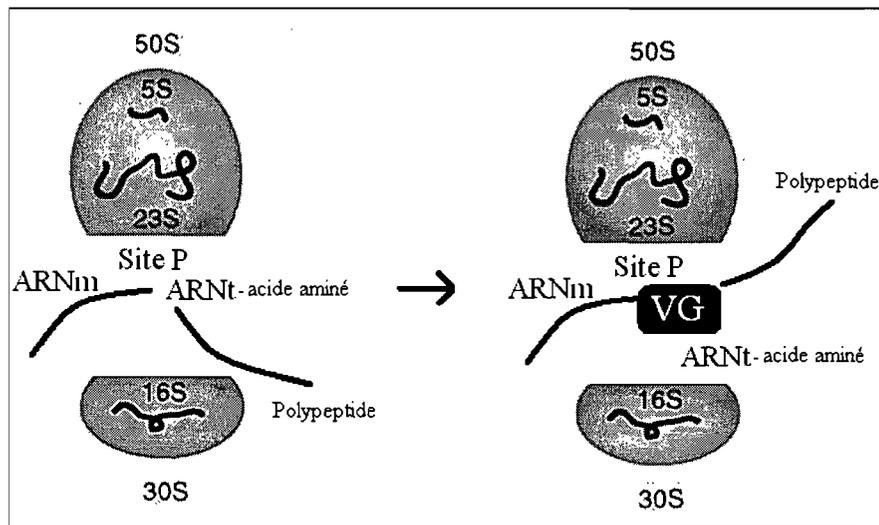
La virginiamycine (VG) est un antibiotique de la classe des streptogramines. Sa production est assurée par le microorganisme *Streptomyces virginiae*. Les antibiotiques de la classe des streptogramines sont en fait une combinaison de deux streptogramines fonctionnant en synergie: les

streptogramines A et B. Dans le cas de la VG, il s'agit de la virginiamycine M et de la virginiamycine S (respectivement les streptogramines A et B) (Cocito 1979). La virginiamycine est actuellement approuvée exclusivement pour l'utilisation comme PC au Canada. Son utilisation en tant que PC est cependant interdite dans la CÉE depuis les années 1990 .

### 1.3.2.1 Mode d'action

La virginiamycine inhibe la synthèse protéique en interférant avec l'action de la peptidyltransférase ; ce phénomène est illustré dans la Figure 2. Tout d'abord, en se liant à la sous-unité 50S du ribosome au site P, qui est l'endroit où un ARNt est lié au peptide en formation, ce qui empêche l'élongation du peptide (les ARNt chargés d'un acide aminé ne peuvent plus se rendre jusqu'au site P). La virginiamycine peut aussi nuire à la synthèse protéique en induisant le détachement du ribosome des ARNt portant les acides aminés, ce qui cause l'arrêt de l'élongation des polypeptides en formation (Chinali, Moureau et Cocito 1984; Chinali, Nyssen, Di Giambattista *et al.* 1988). Bien que chacune des deux VG (M et S) soit bactériostatique lorsque utilisée seule, leur combinaison est bactéricide, et on rapporte que la synergie des deux molécules peut augmenter de 10 à 100 fois leur efficacité bactéricide envers certains microorganismes. (Cocito 1979). Le spectre d'action de la virginiamycine se limite principalement aux bactéries à Gram positif, bien qu'on note son efficacité dans le cas de *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus pertussis*, deux bactéries à Gram négatif (Cocito 1979).

**Figure 2 : Mode d'action de la virginiamycine**



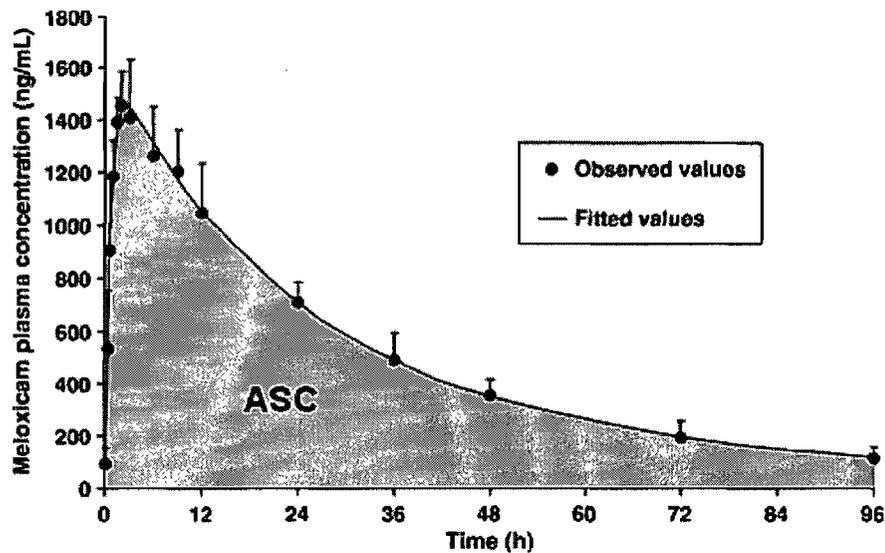
## 1.4 Résistance aux antibiotiques.

### 1.4.1 Pharmacodynamique

Pour comprendre la résistance aux antibiotiques, il faut d'abord comprendre comment ils fonctionnent. Les antimicrobiens ont plusieurs modes d'actions, mais certains principes généraux s'en dégagent. Tout d'abord, un antibiotique a pour effet de perturber la croissance de certains microorganismes. La pharmacodynamique, i.e. la dynamique des produits pharmaceutiques, enseigne que plus un produit se trouve en concentration élevée près de sa cible cellulaire, plus il y a de chance qu'il s'y lie et entraîne donc un effet nuisible chez l'organisme affecté. Pour ce faire, il doit avoir accès à sa cible, i.e. la composante microbienne sur laquelle il aura un effet nuisible (Capitano 2001). L'antibiotique doit aussi, pour pouvoir avoir une effet bactéricide ou bactériostatique, être en concentration suffisante à l'endroit où ces derniers se trouvent, et y rester suffisamment longtemps (Capitano 2001). On appelle concentration minimale inhibitrice (CMI) la concentration la plus faible à laquelle la croissance d'une bactérie donnée est empêchée. C'est la combinaison du temps d'exposition et de la concentration, aussi appelé ASC (aire sous la courbe), qui détermine la survie ou la mort des bactéries ciblées (Nightingale 2001). La figure 3 illustre ce principe. Dans cette expérience on a injecté à des

chats du meloxicam, puis on a mesuré la concentration du médicament dans le plasma à intervalles réguliers (Giraudel, Diquelou, Laroute *et al.* 2005). La partie en gris représente l'ASC. On comprend donc, par exemple, que si la concentration était restée élevée durant le temps, l'ASC aurait été plus grande.

**Figure 3 : Principe d'air sous la courbe en pharmacodynamique<sup>a</sup>**



<sup>a</sup> Figure tirée de Giraudel, Diquelou, Laroute *et al.* 2005

Plus le taux ASC/CMI bactérienne est élevé, plus il y a de chances pour que les bactéries soient éliminées (Nightingale 2001). Les PC, eux, sont souvent utilisés à faible concentration. De plus, la concentration d'ATB est habituellement mesurée dans le sang. Or, les bactéries ciblées par les PC ne résident pas que dans le sang, et il est difficile de vérifier si les taux ASC/CMI suffisants sont atteints dans ces sites autres que le sang (Florea et Nightingale 2004; Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004), surtout que l'ingestion d'ATB par l'eau ou la moulée peut faire varier les quantités d'ATB reçues par chacun des animaux. De faibles taux de ASC/CMI peuvent créer une pression sélective causant une augmentation de la prévalence des bactéries résistantes dans les populations. En effet, les bactéries résistantes auront plus de chance de survivre à l'exposition aux ATB utilisés et deviendront donc proportionnellement plus nombreuses.

### 1.4.2 Causes de la résistance

L'utilisation d'un antibiotique peut mener à une résistance bactérienne envers ce produit (Tenover 2001) ainsi qu'à des ATB de la même classe, et parfois même de classes différentes. Les microorganismes produisant ces composés sont protégés contre leurs effets car ils sont munis de gènes associés à la résistance ; les bactéries naturellement exposées à ces composés ont aussi un avantage évolutif à posséder des moyens de défense (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Par contre en terme de problématique liée à la santé publique, il semble logique de tenter d'éviter la propagation de ces résistances dans la perspective de pouvoir continuer à utiliser un antibiotique important en médecine humaine.

La théorie générale veut qu'une faible dose d'antibiotique favorise la sélection des microorganismes ayant une CMI élevée, et donc la propagation de la résistance à l'antibiotique, alors qu'une dose forte pour un temps donné aura pour effet de tuer rapidement les bactéries (Tenover 2001; Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Dans le cas des PC, la dose administrée est faible comparativement au traitement thérapeutique (environ 20 fois plus faible, par exemple, pour un PC comme la tylosine), cela pourrait donc, théoriquement, favoriser la résistance ou créer une pression sélective. Déjà en 1969, le rapport du comité Swann recommandait que les antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance soient restreints aux antibiotiques n'étant pas utilisés en thérapie humaine ou animale et ne pouvant pas amener de problèmes de résistance croisée (Swann 1969). Il est d'ailleurs possible que la résistance apparaisse dans les productions animales sans qu'aucun promoteur de croissance ne soit utilisé (Van Lunen 2003). Il est de toute façon difficile de vérifier le taux ASC/CMI auquel sont exposées les bactéries *in vivo* et, donc, l'impact réel de l'utilisation des PC antibiotiques, et sa contribution relative à la résistance reste contestée (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004), avec seulement quelques études sur le sujet (Aarestrup et Carstensen 1998; Aarestrup, Hasman, Jensen *et al.* 2002). Plusieurs études portent sur les effets du retrait des PC dans la CÉE (Boerlin, Wissing, Aarestrup *et al.* 2001; Bengtsson et Wierup 2006). L'apparition des ERV en Europe a été liée à l'utilisation de l'avoparcine comme

PC (Bates 1997), mais il existe d'autres possibilités quant à leur origine, comme l'utilisation de la vancomycine dans les hôpitaux (Wade, Rolando, Williams *et al.* 1995), où on en fait parfois un usage intensif. Les causes de la résistance sont donc diverses, et parfois nébuleuses, mais il est généralement accepté que des doses sous-thérapeutiques entraînent la résistance antimicrobienne. Les mécanismes cellulaires par lesquels les bactéries résistent sont abordés dans les sections consacrées à *Enterococcus* et *E. coli*.

### 1.4.3 Conséquences de la résistance

Plusieurs pensent que la principale source de résistance serait un mauvais usage ou un usage excessif d'antibiotiques en thérapie humaine. Par contre, d'autres études suggèrent que des bactéries entériques résistantes peuvent passer des animaux aux humains (des employés de ferme ou d'abattoir par exemple) par contact direct (Fone et Barker 1994; Simonsen, Haaheim, Dahl *et al.* 1998) ou via la chaîne alimentaire (Biavasco, Foglia, Paoletti *et al.* 2007). La présence de ces bactéries dans la flore intestinale des animaux mène à l'établissement d'un réservoir de gènes de résistance aux antimicrobiens (Barton 2000; Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Lorsque la résistance aux antibiotiques est apparue en médecine humaine, les autorités médicales se sont tournées vers des antibiotiques jusqu'alors peu utilisés en antibiothérapie humaine, dont certains sont dans les mêmes classes d'antibiotiques que des PC utilisés chez les animaux de consommation. Par exemple, l'antibiotique quinupristine/dalfopristine (Q/D) a été développé pour traiter les infections causées par des coques à Gram positif multirésistantes (APVMA 2004). La Q/D est dans la même classe d'antibiotique que la virginiamycine, un PC utilisé chez les animaux. Comme le taux d'apparition, sur le marché, des nouveaux agents antimicrobiens a diminué substantiellement dans les dernières années (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004), on pourrait rapidement se trouver avec un manque d'options de traitement si la résistance antimicrobienne continue de progresser chez les agents pathogènes animaux et humains.

La résistance aux antibiotiques est lourde de conséquences dans un contexte où la lutte aux microorganismes pathogènes se fait presque

exclusivement à l'aide de ces substances, et que celles-ci n'existent qu'en nombre limité. Les bactéries résistantes chez les animaux aussi posent problème. La preuve que des bactéries résistantes peuvent passer des viandes animales aux humains a été faite, comme cela est le cas pour *Salmonella* Typhimurium DT104 résistant aux antibiotiques (Ethelberg, Sorensen, Kristensen *et al.* 2007) et *Enterococcus* résistant à la vancomycine (Bates, Jordens et Griffiths 1994). Les salmonelles sont des agents pathogènes reconnus pour se transmettre via la chaîne alimentaire (Barton 2000), et les cas d'infections par *Salmonella* Typhimurium DT104 sont un bon exemple des conséquences que peuvent entraîner une bactérie résistante aux antibiotiques. En effet, cette bactérie possède un îlot de gènes de résistance aux antibiotiques, SGI1 (Glynn, Bopp, Dewitt *et al.* 1998). L'utilisation d'antibiotiques dans le domaine vétérinaire serait probablement un facteur déterminant dans l'acquisition des gènes de résistance par *Salmonella* Typhimurium DT104 (Boyd, Peters, Cloeckaert *et al.* 2001). Les gènes auraient été acquis par l'entremise d'intégrons, des éléments génétiques mobile, sous l'effet d'une pression sélective exercée par des antibiotiques (Sandvang, Aarestrup et Jensen 1998). La distribution de cette espèce bactérienne est maintenant mondiale (Meunier, Boyd, Mulvey *et al.* 2002), et sa résistance aux antibiotiques cause des problèmes de traitement, tant chez les animaux que chez les humains (Poppe, Smart, Khakhria *et al.* 1998; Boyd, Peters, Cloeckaert *et al.* 2001). Dans une étude récente, on a cherché des gènes de résistance dans les intégrons de 211 isolats de *Salmonella enterica* (Khemtong et Chuanchuen 2008). 66% des isolats de cette étude étaient résistants à plusieurs antibiotiques, et les gènes les plus souvent isolés étaient *dfrA1*, *dfrA12* (résistance au triméthoprim) et *aadA2* (résistance aux aminoglycosides). On a aussi trouvé des cas de résistance à l'apramycine chez des isolats humains de *E. coli* et des *Salmonella*, alors que cet antibiotique n'est pas utilisé en médecine humaine (Johnson, Burns, Woodford *et al.* 1994). Une hypothèse possible est que cette résistance origine d'un traitement à l'apramycine chez les animaux. Dans une étude récente on a isolé des *Enterococcus faecium* de la viande de supermarché a indiqué la présence du gène de résistance *ermB*, gène conférant une résistance de type MLS<sub>B</sub> (Donabedian, Perri, Vager *et al.* 2006). Par contre, dans cette même étude, comme les profils de PFGE des isolats d'*E. faecium* portant *ermB* provenant des

humains n'étaient pas identiques à ceux provenant de la viande animale, on n'a donc pas pu directement faire le lien épidémiologique entre les isolats. Le phénotype  $MLS_B$  confère une résistance à plusieurs antibiotiques de la classe des macrolides, des lincosamides et des streptogramines B. Il s'agit d'un phénomène de résistance croisée. La résistance croisée est un phénomène par lequel la présence d'un gène de résistance à un antibiotique donné, par exemple *ermB*, entraîne une résistance à d'autres ATB. En effet, si par exemple, l'utilisation d'un antibiotique de la classe des macrolides entraîne une hausse de la prévalence de *ermB*, cela entraînera également une hausse de la résistance envers les streptogramines et les lincosamides, et non pas seulement envers les macrolides.

#### 1.4.4 Résistance et promoteurs de croissance

Dans le cas de certains antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance, le risque pour la santé publique est plus faible, car ils appartiennent à des classes d'antibiotiques peu ou non utilisées en médecine humaine : bacitracine, bambermicine (Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Par contre, chez le porc, la macrolide tylosine et la streptogramine virginiamycine présentent un danger puisque des antibiotiques de la même classe sont maintenant utilisés en médecine humaine (Phillips I. *et al.* 2004). Aux États-Unis, comme au Canada, la virginiamycine est utilisée comme promoteur de croissance. La résistance aux streptogramines est commune et, par le fait même, la résistance à la quinupristine-dalfopristine, une streptogramine de la même classe que la virginiamycine utilisée en médecine humaine. Il a cependant été démontré, dans une étude au Danemark, que la résistance peut subsister longtemps après le retrait, observant 30% d'isolats résistants dans les fèces en 2001 (Phillips I. *et al.* 2004), malgré le retrait des PC plusieurs années auparavant.

#### **1.4.5 Transmission de la résistance des animaux aux humains et acquisition de bactéries résistantes.**

Il existe donc une possibilité selon laquelle les bactéries résistantes venant des animaux pourraient transférer leurs gènes de résistance aux souches humaines résidentes dans le tractus gastro-intestinal. La fréquence de ce genre de transfert est inconnue, et pourrait être faible. Il y a d'ailleurs eu seulement deux cas rapportés où des ERV ont transmis leurs gènes de résistance à la vancomycine à des *Staphylococcus aureus*. Par contre, d'autres études ont montré que des isolats de ERV provenant de fèces humaines portaient des variantes des gènes *vanX* : *vanT* et *vanG*. Or, ces variantes étaient généralement retrouvées seulement chez les animaux : *vanT* chez les porcs et *vanG* chez les poulets. Le fait qu'on les ait trouvés chez des humains suggère donc une transmission des gènes allant des animaux vers les humains (Phillips I. et al. 2004). D'ailleurs, il existe une expérience dont les résultats et les conclusions vont aussi en ce sens (Lester, Frimodt-Moller, Sorensen *et al.* 2006). Six volontaires ont ingéré des *E. faecium* d'origine animale portant le gène *vanA*. Lester (2006) a trouvé que, dans l'intestin de l'un des volontaires, la résistance à la vancomycine, ainsi que la résistance à la Q/D, avait été transférée à un *E. faecium* d'origine humaine. Selon ces données, il est possible d'émettre l'hypothèse que de supplémenter les aliments des animaux d'élevages avec des PC peut entraîner la sélection de gènes de résistances, et augmenter la prévalence des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les produits de viande de consommation. Le risque associé à cette consommation de viande sera augmenté.

#### **1.4.6 Mécanismes de transfert des gènes de résistance**

Afin de comprendre les risques liés à la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques, il faut connaître les mécanismes par lesquels ces derniers se propagent d'un microorganisme à l'autre. Évidemment, une bactérie transfèrera son bagage génétique, incluant les gènes de résistance, à ses cellules filles en se divisant, c'est la transmission verticale. Les éléments génétiques

mobiles peuvent aussi être responsables de cette propagation. Les transposons sont des segments d'ADN pouvant se déplacer sur le génome à la suite de leur excision. Ces éléments mobiles peuvent passer d'une bactérie à l'autre lors de la division cellulaire, mais peuvent aussi passer d'une espèce à une autre s'ils sont relâchés dans l'environnement, puis acquis par une bactérie d'une espèce différente (transformation) (Lorenz et Wackernagel 1994). Les intégrons sont semblables, mais ont la capacité de capturer des gènes de résistance aux antibiotiques (Ploy, Lambert, Couty *et al.* 2000). On les retrouve chez *Salmonella*, à l'intérieur d'ilôts génomiques (Glynn, Bopp, Dewitt *et al.* 1998). Les plasmides, quant à eux, sont des segments d'ADN circulaires extra-chromosomaux à l'intérieur de la cellule hôte (Frost, Ippen-Ihler et Skurray 1994), et qui peuvent être transférés verticalement lors de la division cellulaire, mais peuvent aussi être transférés à des bactéries (de la même espèce ou d'une espèce différente) par conjugaison. La conjugaison est un contact physique entre deux cellules via un pilus de la cellule donneuse. L'ADN du plasmide est répliqué dans la cellule donneuse et le brin d'ADN nouvellement synthétisé est transféré à la cellule receveuse via le pilus. Certaines souches d'*Enterococcus* possèdent d'ailleurs des gènes facilitant ces transferts (Jett, Huycke et Gilmore 1994). Dans le cas de certaines souches de *Salmonella*, la présence de ces plasmides est même indispensable à la virulence (Guerra, Soto, Helmuth *et al.* 2002). Il est à noter que les éléments génétiques mobiles peuvent contenir plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques. Dans le cas où un antibiotique présent dans le milieu crée une pression sélective favorable aux bactéries possédant un gène de résistance envers cet antibiotique, la transmission d'éléments génétiques mobiles fera en sorte qu'on assistera à la dissémination des gènes résistance présents sur ces éléments.

## 1.5 Microorganismes à l'étude

Plusieurs microorganismes sont hébergés dans le système digestif des porcs, notamment *Enterococcus* sp. et *E. coli* qui sont fréquemment utilisés comme microorganismes indicateurs étant donné qu'ils sont pratiquement toujours présents.

### 1.5.1 *Enterococcus* sp.

*Enterococcus*, une bactérie coque à Gram positif, est présente normalement dans les flores microbiennes intestinales des oiseaux, des mammifères et des humains. Il représente environ 1% de la flore intestinale humaine (Tannock 2002), et y est le cocci à Gram positif prédominant. Chez les humains, on retrouve principalement *E. faecalis*, suivi par *E. faecium*, et ces espèces d'*Enterococcus* sont d'ailleurs aussi celles causant le plus d'infections, autant chez les animaux que chez les humains (Simjee 2006). *Enterococcus* peut être présent dans la viande crue, à des concentrations allant de  $10^2$  à  $10^4$  UFC/g (Simjee 2006). Cette bactérie est également reconnue comme un réservoir potentiel de gènes de résistances aux antibiotiques. Cette caractéristique est d'autant plus importante qu'on a identifié chez *E. faecalis* des phéromones sexuelles, comme Cpd et Cob, des substances aggrégatives permettant un contact étroit entre les bactéries, ce qui favorise la conjugaison et donc le transfert de plasmides (Jett, Huycke et Gilmore 1994). Des facteurs combinés en font un microorganisme à surveiller dans le domaine de la santé publique: présence dans la viande de consommation, réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques et haut taux de transfert.

#### 1.5.1.1 *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV)

Le phénomène de la résistance aux antibiotiques chez *Enterococcus* sp., a pris son importance lorsque l'on a découvert chez *E. faecium* une résistance à la vancomycine chez les porcs et les volailles nourris à l'avoparcine. Le débat fût lancé quant au rôle de l'avoparcine dans l'émergence des ERV chez l'humain : on s'est aperçu que la résistance n'était présente que chez les isolats provenant des fermes utilisant l'antibiotique, et que les éléments génétiques de la résistance à la vancomycine étaient indifférenciables entre les isolats humains et animaux (Barton 2000). La résistance à la vancomycine est principalement transmise par les gènes *van*. Le gène *vanA* est surtout porté par le transposon Tn/546, confère une résistance élevée (32 à 2000 µg/mL) et se retrouve plus

chez *E. faecium* que chez *E. faecalis* (Arthur, Reynolds et Courvalin 1996); *vanB* est quant à lui souvent porté par Tn1547, confère une résistance de faible à forte (4 à 1000 µg/mL) et se retrouve chez ces deux espèces (Leclercq et Courvalin 1997; Klare, Konstabel, Badstubner *et al.* 2003; Courvalin 2006). On note aussi les gènes *vanC*, *vanD*, *vanE* et *vanG*, qui sont des gènes chromosomaux (Courvalin 2006). Les ERV sont un problème croissant dans les hôpitaux, où ils causent de nombreuses infections nosocomiales, et vue l'importance de la vancomycine dans les traitements actuels chez les humains, une attention particulière doit y être portée.

### 1.5.1.2 *Enterococcus* résistants à d'autres antibiotiques

#### Macrolides

On note chez *Enterococcus* une résistance étendue aux macrolides, dont l'érythromycine, un antibiotique utilisé en médecine humaine. Les gènes responsables sont principalement les gènes *erm*, surtout *ermB* et, plus rarement, *ermA*, qui peuvent être transférés sur des éléments génétiques mobiles, par exemple le transposon Tn917 (Shaw et Clewell 1985; Portillo, Ruiz-Larrea, Zarazaga *et al.* 2000). Le mécanisme principal de cette résistance est la méthylation (et parfois diméthylation) de l'ARNr, précisément de la sous-unité 23S du ribosome bactérien, au nucléotide A2058. L'encombrement stérique créé par cette méthylation empêche la liaison efficace des macrolides (et de streptogramines également). *ermB* est un gène responsable du phénotype de résistance MLS<sub>B</sub>. La sortie des antibiotiques hors de la bactérie via une pompe à efflux, empêchant ainsi leur accumulation, est aussi possible. Le gène *mefA* code pour une pompe à efflux conférant une faible résistance à certains macrolides (dont l'érythromycine), avec des CMI de 2 µg/mL à 16 µg/mL (Luna, Coates, Eady *et al.* 1999). MsrC est une protéine de transport de type ABC (ATP-Binding Cassette), et cause donc aussi un efflux, qui confère aussi une résistance aux macrolides et aux streptogramines B, notamment la tylosine de 8 µg/mL à 16 µg/mL (Singh, Malathum et Murray 2001). Les transporteurs ABC sont des structures protéiques servant au transport de molécules, vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule (Dawson et Locher 2006). La structure a

un domaine transmembranaire par lequel les molécules sont transférées, et un domaine liant l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire au transport (Dawson et Locher 2006). On propose que *msrC* aurait son origine chez *Staphylococcus*, car il partage une homologie (entre 53% et 62%) avec le gène *msrA*, retrouvé chez cette espèce (Singh, Malathum et Murray 2001). Certains associent, chez les porcs, la résistance aux macrolides et l'usage de tylosine comme promoteur de croissance (Aarestrup et Carstensen 1998; Boerlin, Wissing, Aarestrup *et al.* 2001), mais il existe aussi des études indiquant le contraire (Davies et Roberts 1999).

### Streptogramines

En réponse à la hausse des ERV on a développé une streptogramine, la quinupristine-dalfopristine (Q/D), qui a une activité élevée contre les bactéries multirésistantes à Gram positif; aucune autre streptogramine n'était utilisée en médecine humaine avant son arrivée, sauf dans certains pays francophones (Thal et Zervos 1999; Barton 2000; Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004). Cependant, la virginiamycine, une streptogramine, est utilisée comme promoteur de croissance depuis longtemps. On s'est donc demandé s'il y aurait une résistance croisée envers à la Q/D, étant donnée l'existence de la résistance à la virginiamycine. Des études subséquentes ont démontré la présence des gènes *vatD* (anciennement *sata*) et *vatE*, qui sont responsables de la résistance aux streptogramines A, et *vgbA*, qui code pour la résistance aux streptogramines B, chez des isolats humains et animaux de *E. faecium* (Barton 2000; Werner, Hildebrandt, Klare *et al.* 2000). Les gènes *vatD* et *vatE* codent pour des acétyltransférases qui inactivent les streptogramines A (dont la VG S) (Thal et Zervos 1999; Simjee, White, Wagner *et al.* 2002). Le gène *vgbA*, lui, code pour une hydrolase qui inactive les streptogramines B (dont la VG M) en clivant leur anneau lactone (Allignet, Loncle, Mazodier *et al.* 1988). Il existe vraisemblablement aussi d'autres gènes de résistance aux streptogramines importants, car des études ont aussi montré que des *E. faecium* résistants à la Q/D isolés de porcs ne contenaient ni *vatD*, *vatE* ou *vgbA* (Donabedian, Perri, Vager *et al.* 2006). L'étude pointait notamment *ermB*, qui avait été retrouvé dans

plusieurs isolats. Le gène *ermB* code pour une méthylase qui transfère un groupement méthyle sur le ribosome bactérien, ce qui cause une résistance aux streptogramines B via le phénotype MLS<sub>B</sub> (Weisblum 1995). Finalement, la pompe à efflux via un transporteur de type ABC, *Lsa*, confère une résistance aux streptogramines A, en plus de conférer une résistance aux lincosamides (Singh, Weinstock et Murray 2002).

#### **Autres résistances**

On note chez *Enterococcus* des résistances à plusieurs autres antibiotiques : aminoglycosides, via *aph(2'')-aac(6')* (dont la gentamycine, utilisée en production porcine) (Aarestrup, Agerso, Gerner-Smidt *et al.* 2000; Chow 2000), lincosamides, via *ermB* et *lsa* (étant une classe affectée par la résistance de type MLS<sub>B</sub>) (Bozdogan et Leclercq 1999), chloramphénicol, via les gènes *cat* (Aarestrup, Agerso, Gerner-Smidt *et al.* 2000), pénicillines, via *pbp* (Aarestrup, Hasman, Jensen *et al.* 2002) et tétracyclines, via *tetM* (portées par Tn916) (Aarestrup, Agerso, Gerner-Smidt *et al.* 2000; Klare, Konstabel, Badstubner *et al.* 2003)). On rapporte aussi que l'utilisation de promoteurs de croissance antimicrobiens crée une pression sélective favorable à *E. faecium*, au détriment d'*Enterococcus gallinarum* (Barton 2000). Le Tableau I présente le résumé des résistances aux streptogramines et macrolides chez *Enterococcus* sp.

**Tableau I : Résumé des résistances d'*Enterococcus* sp.**

Classe d'antibiotiques	Types de résistance	Gènes	Réf.
Streptogramines A	Acétyltransférase	<i>vatD vatE</i>	<i>a</i>
	Efflux	<i>lsa</i>	<i>b</i>
Streptogramines B	Méthylation	<i>ermB</i>	<i>c</i>
	Hydrolyse	<i>vgbA</i>	<i>d</i>
Macrolides	Méthylation	<i>ermB ermA</i>	<i>c</i>
	Efflux	<i>mefA</i>	<i>e</i>
	Efflux ATP dépendant	<i>msrC</i>	<i>f</i>
Lincosamides	Méthylation	<i>ermB</i>	<i>c</i>
	Efflux ATP dépendant	<i>lsa</i>	<i>b</i>
Vancomycine	Modification de la cible	<i>gènes van</i>	<i>a</i>
Aminoglycosides	Phosphotransférase	<i>aph(2'')</i>	<i>g</i>
	Acétyltransférase	<i>aac(6')</i>	<i>g</i>
Chloramphénicol	Acétyltransférase	<i>cat</i>	<i>h</i>
Pénicillines	Protéine liant les pénicillines	<i>pbp5</i>	<i>i</i>
Tétracyclines	Modification du ribosome	<i>tetM</i>	<i>h</i>

a)Thal et Zervos 1999; b)Singh, Weinstock et Murray 2002; c)Shaw et Clewell 1985; d)Allignet, Loncle, Mazodier *et al.* 1988; e)Luna, Coates, Eady *et al.* 1999; f)Singh, Malathum et Murray 2001; g)Chow 2000; h)Aarestrup, Agerso, Gerner-Smidt *et al.* 2000; i)Aarestrup, Hasman, Jensen *et al.* 2002

### 1.5.2 *Escherichia coli*

*E. coli*, un bacille à Gram négatif, est le microorganisme le plus étudié en microbiologie (Blattner, Plunkett, Bloch *et al.* 1997). Cet agent pathogène cause des problèmes en élevage : les *E. coli* entérotoxigéniques sont la cause de la diarrhée post-sevrage, une maladie commune entraînant un fort taux de mortalité et de morbidité chez les porcelets (Gaastra et de Graaf 1982). Des souches de sérotypes différents de *E. coli* entérotoxigéniques peuvent également affecter les humains (Okoh et Osode 2008). La résistance aux antibiotiques de cette bactérie est donc préoccupante.

## Généralités

Des souches de *E. coli* résistantes aux antibiotiques ont été rapportées peu après que l'addition de ces substances dans les moulées soit adoptée. Dans les années 50, on détectait déjà de la résistance à la tétracycline chez des isolats de *E. coli* provenant de porcs nourris avec une moulée supplémentée avec de la tétracycline comme promoteur de croissance, à moins de 100g par tonne (Barton 2000). Il a aussi été rapporté que de nourrir à l'oxytétracycline des porcelets récemment sevrés mènerait à une augmentation rapide de l'incidence de la résistance, et que cette résistance est largement distribuée dans toutes les souches de *E. coli* présentes (Mathew, Garner, Ebner *et al.* 2005). De plus, il semble que l'incidence de la résistance augmente avec l'âge des porcs dans les fermes où on utilise beaucoup d'antibiotiques, alors qu'elle reste plutôt stable ou diminue dans les fermes avec peu ou pas d'antibiotiques dans la moulée (Mathew, Upchurch et Chattin 1998).

## Résistance aux streptogramines et aux macrolides

Les *E. coli* sont relativement résistants aux antibiotiques de la classe des streptogramines et des macrolides. Il s'agit d'une résistance intrinsèque puisque, tout comme les autres membres des *Enterobacteriaceae*, *E. coli* possède une membrane externe peu perméable à ces agents (Nikaido et Vaara 1985). Certaines souches de *E. coli* demeure toutefois sensible à ces agents (les CMI varient entre 2 µg/mL et 256 µg/mL). Le gène *ermB*, conférant une résistance de type MLS<sub>B</sub>, est souvent lié au gène de résistance à la tétracycline *tetM* (Clewell, Flannagan et Jaworski 1995; Salyers, Shoemaker, Stevens *et al.* 1995). De plus, même si les gènes de résistance aux macrolides semblent plus répandus chez les bactéries à Gram positif, certains mécanismes sont associés aux bactéries à Gram négatif. Par exemple, les gènes *ereA* et *ereB* codent pour des estérases (*ere* :érythromycine estérase) hydrolysant des macrolides (Ounissi et Courvalin 1985), alors que *mphA* et *mphB* codent pour des phosphorylases (*mph* : macrolide phosphotransférase) les inactivant (Noguchi, Emura, Matsuyama *et al.* 1995; Noguchi, Katayama et O'Hara 1996). Finalement, des mécanismes

d'efflux non spécifiques aux macrolides peuvent aussi être responsables de la résistance à cette classe d'antibiotiques, comme la pompe à efflux AcrAB-TolC, qui confère une résistance à l'érythromycine (Elkins et Nikaido 2002; Baucheron, Tyler, Boyd *et al.* 2004; Euzéby 2007).

### **Autres résistances**

Les *E. coli* sont résistants à plusieurs classes d'antibiotiques, dont les  $\beta$ -lactamines (dont les pénicillines) et les céphalosporines via les  $\beta$ -lactamases et les modifications des protéines liant les pénicillines («penicillin binding proteins», via les gènes *pbp*) (Euzéby 2007), qui sont souvent portés sur des éléments génétiques mobiles. Ces éléments mobiles portent parfois des gènes de résistances à plusieurs antibiotiques. On note chez *E. coli* une résistance à l'apramycine, via le gène *aac(3)-IV*, dans les fermes où cet antibiotique est utilisé ; le gène *aac(3)-IV* confère aussi la résistance à la gentamycine, ATB utilisé en médecine humaine (Jensen, Jakobsen, Emborg *et al.* 2006). Il faut aussi mentionner les résistances aux quinolones grâce à la pompe à efflux AcrAB (Mazzariol, Tokue, Kanegawa *et al.* 2000) et au gène plasmidique *aac(6')-Ib-cr* (Robicsek, Strahilevitz, Jacoby *et al.* 2006), aux tétracyclines par les gènes *tet* (les tétracyclines sont utilisées en élevage chez les porcs) et au chloramphénicol via des pompes à efflux comme AcrAB-TolC (Euzéby 2007).

Chez *E. coli*, la possibilité que l'exposition aux PC entraîne une résistance à d'autres classes d'antibiotiques existe, et il est important de vérifier l'apparition de ces résistances croisées car elles peuvent compliquer les traitements des animaux et des humains.

**Tableau II : Résumé des résistances d'*E. coli* aux streptogramines et aux macrolides**

Classe d'antibiotiques	Types de résistance	Gènes	Réf.
Streptogramines B	Méthylation	<i>ermB</i>	<i>a</i>
Macrolides	Efflux	<i>acrAB-tolC</i>	<i>b</i>
	Méthylation	<i>ermB</i>	<i>a</i>
	Hydrolyse	<i>ereA ereB</i>	<i>c</i>
	Phosphorylation	<i>mphA mphB</i>	<i>d</i>

a)Clewell, Flannagan et Jaworski 1995; b)Elkins et Nikaido 2002; c)Ounissi et Courvalin 1985;

d)Noguchi, Katayama et O'Hara 1996

## 2 Article scientifique

### Title

Evaluation of the use of Tylosin and Virginiamycin on feed conversion and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. isolated from swine in field conditions.

### Authors

Ulysse Desranleau Dandurand, Sylvain Quessy, Edward Topp and Ann Letellier

### Abstract

Recent events, such as the vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) episodes in european countries have raised questions about the possibility that antibiotic growth promoters (GP) used in animal production may contribute to the increase in antimicrobial resistance seen in human pathogens. The objective of our study was to evaluate the impact of two antimicrobial growth promoters used in Canada, tylosin and virginiamycin, on the resistance profiles of *E. coli* and *Enterococcus* sp. isolated from swine as well as to evaluate their effect on feed efficiency. Two consecutive trials were conducted in a swine farm in Québec. In each of these trials, 300 hogs originating from the same nursery were separated into three groups, each group receiving one of three specific diets during 15 weeks: feed with no additive, feed supplemented with 22 ppm virginiamycin and feed supplemented with 44 ppm tylosin. *E. coli* and *Enterococcus* sp. were isolated from animal feces at the first and the fifteenth week of each trial and were tested for antimicrobial resistance towards several antibiotics using the disk diffusion method. The MIC of the microorganisms against the GP used in the trials were also evaluated, using the agar dilution technique. There was no significant difference in feed consumption between the groups receiving GP and the control group ( $p=0,13$ ). Mortality ( $p=0,88$ ) and withdrawals due to sickness rates ( $p=0,87$ ) were also similar in all groups. There were several significant changes in the resistance profiles of both *E. coli* and *Enterococcus* sp.; *E. coli* isolates at the fifteenth week were resistant to more

antibiotics in the groups receiving a diet supplemented with GP whereas no overall increase of resistance was noted in *Enterococcus* sp. isolates. Most *Enterococcus* sp. isolates from all groups were resistant to the GP used in the trial from the start, with MIC  $\geq 1024\mu\text{g}$  for tylosin and  $\geq 256\mu\text{g}$  for virginiamycin. According to this study, it appears that the use of antimicrobial GP in animal feed does not improve the feed efficiency in swine production, however antimicrobial resistance of both *E. coli* and *Enterococcus* sp. toward several antibiotic are modified.

### Introduction

Early after the beginning of the use of antibiotics in human therapy, it was discovered that low level of antibiotics could also improve the growth of farm animals (Stokstad, Jukes et Pierce 1949). Although the exact mechanisms of action of GP are not fully known, it is proposed that they may inhibit the growth of some microorganisms in the gut of the animals, thus nutrients loss. This inhibition could also promote the growth of commensal species which break down complex sugars that are then available for the animal. Less pathogenic bacteria also means less microbial infections, which leads to a thinner intestinal mucosa that is more permeable to nutrients. The use of GP has been part of most animal productions in developed countries until recently. Some recent studies, however, concluded that little or no improvement was made on the growth performance of farm animals (Van Lunen 2003), and this use of antimicrobials is still controversial (Collignon 2004; Phillips, Casewell, Cox *et al.* 2004)

The decision to ban antimicrobial GP was motivated partially by the fact that an epidemic of vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) spread in European hospitals in the early 1990's. *Enterococcus* is a normal resident of human and animal gut microflora, but it can also cause diseases that can normally be cured easily with vancomycin. Resistant strains are a serious threat to public health. It was then demonstrated that some of these VRE strains originated from animal sources (Bogaard 2000; Angulo, Nargund et Chiller 2004). In Europe, the prevalence of VRE in animal production was linked to the

use of avoparcin, a glycopeptide related to vancomycin, as a growth promoter in animal feed.

Quinupristin/Dalfopristin (Q/D), an antibiotic of the streptogramin class recently developed, is sometimes a viable choice when confronted to VRE (Garrigues 2002). Q/D is related to virginiamycin, a streptogramin used as GP in animal production. Genes encoding for virginiamycin resistance in *Enterococcus*, *vatD*, *vatE* and *ermB*, also confer resistance towards Q/D (Hershberger, Donabedian, Konstantinou *et al.* 2004).

Tylosin, an antibiotic of the macrolide class, is also used as a GP (Dewey, Cox, Straw *et al.* 1997). Like avoparcin and virginiamycin, tylosin is related to antibiotics used in human medicine; erythromycin is a macrolide used against Gram positive cocci, but also against agents causing pulmonary infections, such as *Legionella pneumophila*, a Gram negative bacteria (Baltch, Bopp, Smith *et al.* 2005).

It is widely accepted that exposure to subtherapeutic doses of antibiotics may lead to antimicrobial resistance (Tenover 2001). A dose of antibiotics that fails to kill will select resistant bacteria. These bacteria will become more numerous and their resistance genes can be transferable to other bacteria, of the same species or other, through horizontal transfer. Little is known about the specific role that GP play in the incidence of resistance, mainly because therapeutic and prophylactic treatments are often used in conjunction with them in field conditions.

The objective of this study was to evaluate the feed efficiency gain conferred by two antimicrobial growth promoters used in Canada, virginiamycin and tylosin, as well as evaluate their effects on the antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus* sp. and *E. coli* isolated from swine in field conditions.

## Materials and Methods

### Farm trials

Two consecutive identical trials were conducted in a commercial swine production facility in Québec. In each trial, hogs of approximately 10 weeks of age and originating from the same nursery were distributed in 3 groups (280 hogs in the first trial, 300 hogs in the second trial). They had received no antibiotics prior to the trials. All groups were housed in the same building, but in physically separate areas. Each group was fed (ad libitum) one of three diets during 15 weeks, in their growth-finishing period. The diets contained no growth promoter (control), tylosin at 44 ppm or virginiamycin at 22 ppm. Fecal samples from all 3 groups, gathered randomly in 50 spots per group, were collected at the beginning (week 0) and the end of the trials (week 15). The samples from the same group were then pooled, and the resulting pools of faecal samples were then thoroughly homogenized before analysis, as recommended by Dunlop (Dunlop, McEwen, Meek *et al.* 1999). This resulted in 6 different pools per trial: a pool at the beginning and at the end of the treatment for each of the 3 groups. Farm personnel were advised to change footwear when moving from one area to another to avoid carrying over bacteria from one group to another. Any pig that needed to be treated therapeutically with antimicrobial agents during a trial was withdrawn from the group before treatment and put in a specific area, separated from other groups.

Each pig was weighted at the beginning and at the end of the trials to evaluate weight gain. Farm personnel kept a record of the feed intake in every group. The feed consumption of removed pigs was subtracted in each group for the feed efficiency calculations. The feed efficiency for every group was measured, and was calculated using the formula: (animal weight gain) ÷ (feed consumption). Mortalities and withdrawals were recorded for each group during all the trial period. The tests used to determine significant changes in feed efficiency as well as in mortality/withdrawal rates were logistic regressions.

### Bacterial isolation

*E. coli* and *Enterococcus* sp. were then isolated from the fecal samples. No less than 15 *E. coli* isolates and 15 *Enterococcus* sp. isolates were obtained from each pool of fecal samples.

For *Enterococcus*, samples were plated onto mEnterococcus agar (Difco) and incubated at 37°C for 48h. Isolated typical colonies (burgundy coloured) were then streaked onto Brain Heart Infusion agar (Difco), 37°C 16-24h. Isolated colonies were then streaked onto Enterococcosel agar (BBL) 37°C, 16-24h. Colonies positive for esculin hydrolysis (black pigment in the media) were picked into a sterile 96-well microplate containing 100µL/well of Brain Heart Infusion broth (Difco), 37°C 16-24h. Microplate cultures were then screened for growth in Brain Heart Infusion broth + 6.5% NaCl and for catalase activity (negative for *Enterococcus*). Confirmed *Enterococcus* isolates were then transferred in fresh Brain Heart Infusion broth containing 30% glycerol, and kept at -80°C until further use.

For *E. coli*, 10g of sample were incubated in 90 ml of Nutrient Broth (EMD) at 37°C for 16-24h. The broth was then plated on MacConkey agar (BD) and incubated at 37°C for 16-24 hours. Typical colonies (pink) were then streaked on 5% Sheep Blood Agar (Oxoid) and incubated at 37°C for 16-24 hours. A typical colony was then used for biochemical tests: Triple Sugar Iron agar (BD), Citrate agar (BD), Urea agar (BD) and oxidase activity. Furthermore, 1 in 10 positive isolates was identified using an API gallery (Biomérieux). Confirmed *E. coli* isolates were then kept in a 30% glycerol solution at -80°C until further use.

### Phenotypic antimicrobial resistance

#### *Disk diffusion*

Isolates from both species (*E. coli* n=171; *Enterococcus* n=180) were then tested for resistance to selected antimicrobial agents using the disk diffusion method (Oxoid), in accordance to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) guidelines. Isolates were grown for 18 hours on 5% Sheep Blood Agar (Quélab) before being added to a 0,85%

NaCl solution to obtain a 0,5 MacFarland standard opacity. The bacterial solution was plated on Mueller-Hinton agar (Oxoid), and the disks were then applied. The plates were then incubated for 18 hours at 37°C. A resistant/susceptible notation was then awarded to the isolates for each antibiotic that was tested according to the diameter of the inhibition zones. Control strains of *E. coli* and *Enterococcus* were used. The test used to determine significant changes was Cochran-Mantel-Haenszel. This test allows several stratas to be included in the statistical analysis.

#### *MIC of growth promoters*

Tylosin and virginiamycin MICs for *Enterococcus* isolates (n=180) were assessed using the agar dilution technique. For tylosin, a reference standard was obtained (Elanco-Lilly, Indianapolis, IN). For virginiamycin, we extracted the antibiotic from Virginiamycin 44 (Bio-Agri-Mix, Mitchell, ON) using acetone, up to a 20 mg concentration (Cocito 1979). Virginiamycin and tylosin were added to 50°C Mueller-Hinton agar, to create doubling concentrations ranging from 2 µg/mL to 256 µg/mL and 2 µg/mL to 1024 µg/mL respectively, before being poured in plates. An aliquot of 10 µL of the same bacterial suspensions that were used for disk diffusion were inoculated on the plates for each dilution and incubated for 18 hours. A susceptible *E. faecalis* strain as well as a resistant *E. coli* strain were used as controls.

#### Serotyping

To investigate a possible selective pressure, *E. coli* isolates from the second trial were tested to identify their serotypes (Orskov et Orskov 1984).

## Results

### Zootechnical performance

Table I indicates the average weight gain for each group of pigs ( $\bar{x} \pm sd$ ).

**Table I: Feed efficiency of all groups during both trials ( $\bar{x} \pm sd$ ).**

Diets	Control	Tylosin	Virginiamycin
Trial 1	0,4014±0,0133	0,4068±0,0111	0,4084±0,0097
Trial 2	0,3898±0,0231	0,4104±0,0266	0,3990±0,0125
Average	0,3956±0,0044	0,4086±0,0046	0,4037±0,0026

The feed efficiencies were very similar in all groups. Overall, no significant differences were found between groups fed with supplemented diet with antimicrobials agents and the control group ( $p=0,13$ ), and between both trials ( $p=0,21$ ). A greater feed efficiency for the tylosin fed group during the second trial was the only significant difference found ( $p=0,0261$ ).

Table II presents the number of mortalities (M) and withdrawals (W) due to sickness in all groups during the treatments.

**Table II: Numbers of mortalities (M) and withdrawals (W) due to sickness of pigs in all groups during both trials.**

Diets	Control (n=190)		Tylosin (n=200)		VG (n=190)	
	D	W	D	W	D	W
Trial 1	2	10	1	16	0	11
Trial 2	2	15	2	17	0	13
Total	4	25	3	33	0	24

Overall, the situation was similar in all groups. There were no significant difference in the mortality ( $p=0,88$ ) or the withdrawals due to sickness ( $p=0,87$ ) rates in groups. Also, the results of trial 1 and trial 2 for mortality ( $p=0,99$ ) and withdrawals due to sickness ( $p=0,50$ ) rates were not significantly different.

### Antimicrobial resistance

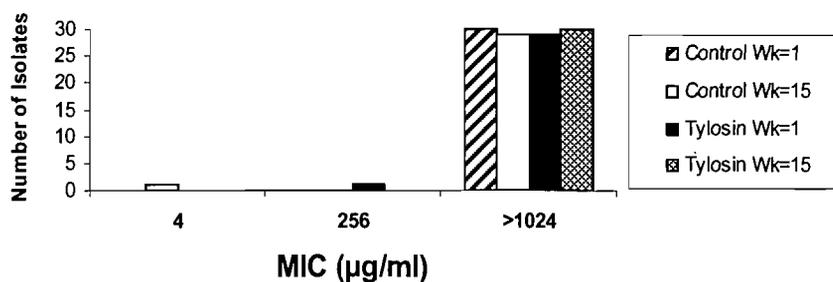
Tables III and IV display the antimicrobial agents against which a significant ( $p < 0.05$ ) increase or decrease in the percentage of resistant isolates was observed based on the results of the disk diffusion test.

The use of GP was associated to specific changes in resistance phenotypes in *E. coli* and, especially, in *Enterococcus* sp. The number of antibiotics to which isolates were resistant after the treatment remained relatively stable for *Enterococcus* sp, whereas it increased in *E. coli* isolates from the tylosin and virginiamycin groups.

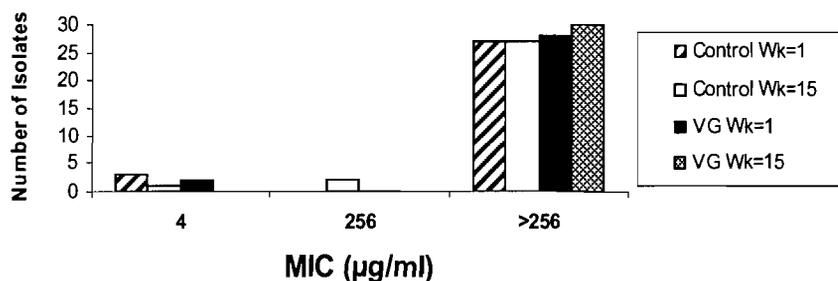
### MIC of growth promoters

The MICs of the growth promoters were tested in *Enterococcus* isolates. Figures 1 and 2 show the numbers of isolates for given tylosin and virginiamycin MIC respectively, at the beginning and the end of the trials.

**Figure 1: MIC for Tylosin in *Enterococcus* Isolates**



**Figure 2: MIC for Virginiamycin in *Enterococcus* Isolates**



**Table III: Significant ( $p < 0.05$ ) changes between Week 1 and Week 15 in the percentage of *E. coli* isolates resistant to antimicrobial agents for each diet.**

Diets	Antibacterial Agents with Significant Increase of Resistant Isolates Percentage			Antibacterial Agents with Significant Decrease of Resistant Isolates Percentage		
	Antimicrobial Agent <sup>a</sup>	Wk=1 (%)	Wk=15 (%)	Antimicrobial Agent	Wk=1 (%)	Wk=15 (%)
No Additive		No change		AMP	62,1±9,2	33,3±8,8
Tylosin	C	4,0±4,0	30,3±8,8	E	92,0±5,5	63,3±8,9
	N	12,0±6,6	40,0±9,1			
	K	12,0±6,6	50,0±9,3			
	KF	8,0±5,5	43,3±9,2			
VG	C	3,3±3,3	25,9±8,6	TE	86,7±6,3	55,6±9,7
	E	70,0±8,5	100±0,0			
	RL	20,0±7,4	44,4±9,7			

<sup>a</sup>AMP : Ampicillin ; C: Chloramphenicol; E: Erythromycin; K: Kanamycin; KF: Cephalotin; N: Neomycin; RL: Sulfamethoxazol ; TE : Tetracyclin.

**Table IV: Significant ( $p<0.05$ ) changes between Week 1 and Week 15 in the percentage of *Enterococcus* sp. isolates resistant to antimicrobial agents for each diet.**

Diets	Antibacterial Agents with Significant Increase of Resistant Isolates Percentage			Antibacterial Agents with Significant Decrease of Resistant Isolates Percentage		
	Antimicrobial Agent <sup>a</sup>	Wk=1 (%)	Wk=15 (%)	Antimicrobial Agent	Wk=1 (%)	Wk=15 (%)
No Additive	AMP	16,7±6,9	50,0±9,3	APR	96,7±3,3	60,0±9,1
	KF	60,0±9,1	93,3±4,6	CN	83,3±6,9	50,0±9,3
				K	96,7±3,3	80,0±7,4
Tylosin	C	0,0±0,0	13,3±6,3	AMP	30,0±8,5	10,0±5,6
	CN	70,0±8,5	90,0±5,6	CIP	13,3±6,3	0,0±0,0
	RL	83,3±6,9	100,0±0,0	ENR	50,0±9,3	26,7±8,2
				SXT	13,3±6,3	0±0
VG	AMP	3,3±3,3	23,3±7,9	APR	100,0±0,0	86,7±6,3
				B	73,3±8,2	3,3±3,3
	KF	60,0±9,1	86,7±6,3	CIP	30,0±8,5	0,0±0,0
				SXT	36,7±8,9	10,0±5,6

<sup>a</sup>AMP : Ampicillin; APR: Apramycin; B : Bacitracin; C: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin ; CN: Gentamycin; ENR: Enrofloxacin; K: Kanamycin; KF: Cephalotin; RL: Sulfamethoxazol; SXT: Trimethoprim/sulfas TE : Tetracyclin.

Most *Enterococcus* isolates were resistant to the highest concentrations tested (1024 µg/mL for tylosin, 256 µg/mL for virginiamycin) at the beginning and the end of the trials. For both VG and tylosin, concentrations of 2, 8, 16, 32, 64, and 128 µg/mL (as well as 512 µg/mL for VG only) were also tested, but no isolates were found to have these MIC, and so they are not shown in Figures 1 and 2. The *E. faecalis* control strain used was sensitive to both tylosin and virginiamycin (MICs of 4 µg/mL and 8 µg/mL respectively).

#### Serotypes of *E. coli* isolates

*E. coli* isolates from the second trial were tested to determine the prevalence of the different serotypes in the three groups, at week 1 and week 15. Results are shown in table V; arrows indicate an increase or decrease of a given serotype over the course of the trial.

**Table V: Percentages of serotypes in *E. coli* isolates of trial 2**

Control			Tylosin			Virginiamycin		
	Wk1	Wk 15		Wk 1	Wk 15		Wk 1	Wk 15
O2	57%	0% ↓	O2	64%	0% ↓	O2	56%	0% ↓
O6	7%	0% ↓	O20	0%	38% ↑	O86	0%	10% ↑
O98	7%	0% ↓	O45	0%	25% ↑	O112ab	0%	50% ↑
O115	29%	50% ↑	O88	9%	0% ↓	O115	22%	0% ↓
O126	0%	50% ↑	O111	9%	0% ↓	O125	0%	10% ↑
			O112ab	0%	25% ↑	O126	0%	30% ↑
			O126	18%	0% ↓	O132	22%	0% ↓
			O173	0%	13% ↑			
n	14	14		11	8		9	10

n = number of isolates tested

There is a great variation in *E. coli* serotypes between groups at week 1. This indicates a great diversity of *E. coli* serotypes in pig fecal matters. *E. coli* serotypes changed vastly between week 1 and week 15. Serotype O2 was predominant at week 1 in all groups, but completely disappeared at week 15. Except for serotype O115 in the control group, no serotype was found both at week 1 and week 15 in a particular group.

## Discussion

The use of antibiotic growth promoters has long been a common and accepted practice in veterinary medicine. Even though this practice seemed to be safe and useful when it was first introduced 60 years ago, it is now necessary to reassess its safety and usefulness since new health concerns have arisen and production methods have changed (Wierup 2001).

In this study, the use of GP tylosin and virginiamycin does not seem to have enhanced performances in pigs. In the supplemented groups, there was no significant difference with the control groups ( $p=0,13$ ). Mortality ( $p=0,88$ ) and withdrawals due to sickness ( $p=0,87$ ) were also similar and no significant differences were found between groups. These findings are in accordance with the conclusions of Van Lunen who conducted a similar study with tylosin in a swine production facility in Canada (Van Lunen 2003) and those of the Australian JETACAR for virginiamycin use in broiler chicken (JETACAR 1999). Van Lunen (2003) concluded that effective biosecurity measures could be responsible for the lack of difference between swine herds fed with and without GP. There are, however, conflicting reports on that issue, as some studies report higher incidence of diarrhoea and increased mortality (Callesen 2002; Jensen 2006).

Disk diffusion results for *E. coli* (shown in table III) show a trend indicating that the GP used in the trial did increase antimicrobial resistance for this species since no increase in the number of resistance was observed for the control group, but there was an increase in the number of resistant isolates for 4 antibiotics (C, N, K, KF) in the tylosin group and 3 antibiotics (C, E, RL) in the virginiamycin group. The decrease in ampicillin (AMP) resistant isolates for the control group is in accordance with a recent study that compared resistance in *E. coli* isolated from farms that use GP and isolated from farms that do not (Bunner, Norby, Bartlett *et al.* 2007). Ampicillin resistance is known to be conferred by plasmidic gene *bla<sub>TEM-1</sub>*. The presence of genes conferring resistance to GP used in the trials on a plasmid also harbouring *bla<sub>TEM-1</sub>* could have maintained this gene's prevalence in both treatment groups, whereas its

prevalence decreased in the control group, explaining the drop in the percentage of isolates resistant to ampicillin. *bla*<sub>TEM-1</sub> has recently been found on plasmids carrying macrolide resistance genes *ermB* and *mphA* (Soge, Adeniyi et Roberts 2006). The decrease in the number of isolates resistant to erythromycin (E) in the tylosin group is unexpected since they are both macrolides and cross-resistance between them is often observed. There are, however, also reports of resistance mechanisms that are specific to tylosin alone, involving methylation of two ribosomal sites, A2058 and G748 (Liu et Douthwaite 2002). In the same group, resistance to chloramphenicol (C), neomycin (N) and kanamycin (K) are known to be related to efflux pump AcrAB-TolC, in conjunction with gene *acrD*, in *E. coli* (Rosenberg, Ma et Nikaido 2000; Aires et Nikaido 2005). This pump is also known to be effective on macrolide like tylosin (Baucheron, Tyler, Boyd *et al.* 2004; Chollet, Chevalier, Bryskier *et al.* 2004), which could explain the increase in the number of isolates resistant to these 3 antibiotics. In the virginiamycin group, resistance to erythromycin was found in more isolates at week 15. This increase could be attributed to the higher prevalence of a gene conferring a MLS<sub>B</sub> resistance phenotype, such as the *erm* genes (cross-resistance between virginiamycin, a streptogramin, and erythromycin (E), a macrolide).

Serotyping of *E. coli* isolates revealed a great variation of the serotypes present in the fecal matters of pigs. Changes were observed in all groups, and the control group was the only group where a given serotype, in this case O115, was found both at the beginning and the end of the trial. In the GP treated groups, all serotypes found at the beginning were not recovered at the end. The small number of isolates tested combined with the great variations observed does not allow the evaluation of the effects of the GP on *E. coli* serotypes.

For *Enterococcus* sp. changes in antibiotic resistance phenotypes were numerous in all groups, but they were more equally distributed between increases and decreases; overall there were more decreases, as it is shown in table IV. It is interesting to note that while the percentages of resistance in *E. coli* isolates from the control group remained relatively stable, there were many changes in *Enterococcus* sp. isolates. This suggests that resistance phenotypes are subject to modification even without any selective pressure from an

antimicrobial agent. This is also supported by the fact that the increases in resistance in both the control group and the virginiamycin group were identical, as there were more isolates resistant to ampicillin (AMP) and cephalotin (KF). Those two groups also share a decrease in the number of apramycin (APR) resistant isolates. On the other hand, the modifications were quite different for isolates that were exposed to tylosin, suggesting a greater impact of this GP than that of virginiamycin.

The results of MIC test for *Enterococcus* sp. show that most of the isolates in all groups, including the control, were already highly resistant to both tylosin and virginiamycin. The *ermB* gene, conferring a MLS<sub>B</sub> resistance pattern, could be partly responsible for these resistances. In 2006, Donabedian reported that, out of 61 *Enterococcus faecium* isolated from swine, 98% carried *ermB* (Donabedian, Perri, Vager *et al.* 2006). In the same study, however, it was shown that isolates were relatively sensitive to Quinupristin/Dalfopristin (Q/D), a streptogramin closely related to virginiamycin, so other streptogramin resistance genes must be present in our isolates, like the *vatD*, *vatE* or *vgbA* (Allignet, Loncle, Mazodier *et al.* 1988; Thal et Zervos 1999).

In regards to the zootechnical performances, the biosecurity measures in place at the experimentation site may be one possibility related to the lack of significant improvements in GP fed group. A lower exposure to new microorganisms could diminish their usefulness since some of the modes of action proposed for GP involve stimulation for the immune system and decrease of subclinical infections (Gaskins, Collier et Anderson 2002). Also, the MIC tests showed that *Enterococcus* sp. isolates were already highly resistant to both GP used in the trials. It is reasonable to believe that the killing and bacteriostatic effects of the GP were less than they would have been if they were present with sensitive microorganisms. It would be useful to continue MIC evaluations to see if levels of resistance are also high in species other than *Enterococcus*.

The resistance phenotypes observed for *E. coli* isolates exposed to GP at the end of the trials could be the result of either selective pressure or gene acquisition. Mobile genetic elements carrying multiple resistance genes related

to the antibiotics shown in table III (chloramphenicol (C), aminoglycosides (Neomycin (N) and Kanamycin (K)), erythromycin (E)) are known to exist (Baucheron, Tyler, Boyd *et al.* 2004; Chollet, Chevalier, Bryskier *et al.* 2004; Aires et Nikaido 2005). PCR targeting genes that are likely responsible could help clarify the trends observed. The efflux pump AcrAB-TolC, notably, confers resistance to these four antibiotics (Elkins et Nikaido 2002). The dual monomethylations of the bacterial ribosome conferring high level of resistance that is specific to tylosin could have been responsible of a selective pressure favouring a certain phenotype in *E. coli* (Liu et Douthwaite 2002; Douthwaite, Crain, Liu *et al.* 2004).

The wide array of changes in *Enterococcus* sp. isolates could be attributed to selective pressure. The number of antibiotics to which an *Enterococcus* isolate was resistant (including intrinsic resistance) at week 1 ranged from 8 to 17, and isolates were equally distributed in that interval. At week 15, most *Enterococcus* sp. isolates from the GP fed groups were resistant to either 12 or 13 antibiotics (data not shown). No change was observed in the control group between week 1 and week 15. This could mean that, while there was no net increase in the mean number of antibiotics to which isolates were resistant, the number of phenotypes present could have been reduced in the groups fed with GP. PFGE patterns of the isolates tested could help verify that assumption.

## Conclusion

According to our results, it appears that the use of antimicrobial growth promoters tylosin and virginiamycin does not economically benefit swine productions during the growing-finishing period, when herds are in good health condition. At the same time, while these GP seem to play a role in the modification of resistance phenotypes of *E. coli* and *Enterococcus* sp, it is not possible to conclude that this use results in an increase of antimicrobial resistance. Real time PCR assays, targeting genes that are likely to be present in total microflora by total DNA extract of the fecal samples collected (like *ermB*), will reveal if there was an increase in the number on copies during the trials.

This is important because, while *E. coli* and *Enterococcus* sp. seemed to have been resistant to the GP used, they can also act as gene reservoirs, and transfer antimicrobial resistance genes to other species. PFGE testing of the isolates will reveal the presence, if any, of a selective pressure favouring strains harbouring certain phenotypes in the population.

## References

Aires, J. R. et H. Nikaido (2005). "Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(6): 1923-9.

Allignet, J., V. Loncle, P. Mazodier et N. el Solh (1988). "Nucleotide sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vgb*, encoding a hydrolase inactivating the B components of virginiamycin-like antibiotics." Plasmid **20**(3): 271-5.

Angulo, F. J., V. N. Nargund et T. C. Chiller (2004). "Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51**(8-9): 374-9.

Baltch, A. L., L. H. Bopp, R. P. Smith, P. B. Michelsen et W. J. Ritz (2005). "Antibacterial activities of gemifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and erythromycin against intracellular *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in human monocytes." J Antimicrob Chemother **56**(1): 104-9.

Baucheron, S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla et A. Cloeckaert (2004). "AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3729-35.

Bogaard, A. E. v. d. (2000). "Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans." International Journal of Antimicrobial Agents **14**: 327-335.

Bunner, C. A., B. Norby, P. C. Bartlett, R. J. Erskine, F. P. Downes et J. B. Kaneene (2007). "Prevalence and pattern of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolated from pigs reared under antimicrobial-free and conventional production methods." J Am Vet Med Assoc **231**(2): 275-83.

Callesen, J. (2002). Effects of termination of AGP use on pigwelfare and productivity. International Invitational Symposium: Beyond Antibiotic Growth Promoters in Food Production. Foulum, Denmark.

Chollet, R., J. Chevalier, A. Bryskier et J. M. Pages (2004). "The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **48**(9): 3621-4.

Cocito, C. (1979). "Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components." Microbiol Rev **43**(2): 145-92.

Collignon, P. (2004). "Antibiotic growth promoters." J Antimicrob Chemother **54**(1): 272; author reply 276-8.

Dewey, C. E., B. D. Cox, B. E. Straw, E. J. Bush et H. S. Hurd (1997). "Associations between off-label feed additives and farm size, veterinary consultant use, and animal age." Prev Vet Med **31**(1-2): 133-46.

Donabedian, S. M., M. B. Perri, D. Vager, E. Hershberger, P. Malani, S. Simjee, J. Chow, E. N. Vergis, R. R. Muder, K. Gay, F. J. Angulo, P. Bartlett et M. J. Zervos (2006). "Quinupristin-dalfopristin resistance in *Enterococcus faecium* isolates from humans, farm animals, and grocery store meat in the United States." J Clin Microbiol **44**(9): 3361-5.

Douthwaite, S., P. F. Crain, M. Liu et J. Poehlsaard (2004). "The tylosin-resistance methyltransferase RlmA(II) (TlrB) modifies the N-1 position of 23S rRNA nucleotide G748." J Mol Biol **337**(5): 1073-7.

Dunlop, R. H., S. A. McEwen, A. H. Meek, R. M. Friendship, W. D. Black et R. C. Clarke (1999). "Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs." Epidemiol Infect **122**(3): 485-96.

Elkins, C. A. et H. Nikaido (2002). "Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops." J Bacteriol **184**(23): 6490-8.

Garrigues, B. (2002). "[Synercid emergency prescription program. The French experience]." Presse Med **31**(7): 297-301.

Gaskins, H. R., C. T. Collier et D. B. Anderson (2002). "Antibiotics as growth promotants: mode of action." Anim Biotechnol **13**(1): 29-42.

Hershberger, E., S. Donabedian, K. Konstantinou et M. J. Zervos (2004). "Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology." Clin Infect Dis **38**(1): 92-8.

Jensen, H. M. (2006). "Health management with reduced antibiotic use - experiences of a Danish pig vet." Anim Biotechnol **17**(2): 189-94.

JETACAR (1999). The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans. Report of the Joint Expert Technical advisory Committee on Antibiotic Resistance (JETACAR), Commonwealth of Australia.

Liu, M. et S. Douthwaite (2002). "Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14658-63.

Orskov, F. et I. Orskov (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. Methods in microbiology. T. B. a. J. R. Norris. London, Academic Press. **14**: 44-112.

Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston et J. Waddell (2004). "Does the use of antibiotics in food

animals pose a risk to human health? A critical review of published data." J Antimicrob Chemother **53**(1): 28-52.

Rosenberg, E. Y., D. Ma et H. Nikaido (2000). "AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump." J Bacteriol **182**(6): 1754-6.

Soge, O. O., B. A. Adeniyi et M. C. Roberts (2006). "New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*." J Antimicrob Chemother **58**(5): 1048-53.

Stokstad, E. L. R., T. H. Jukes et J. Pierce (1949). "The multiple nature of the animal protein factor." Journal of Biological Chemistry **180**(2): 647-54.

Tenover, F. C. (2001). "Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview." Clin Infect Dis **33 Suppl 3**: S108-15.

Thal, L. A. et M. J. Zervos (1999). "Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins." J Antimicrob Chemother **43**(2): 171-6.

Van Lunen, T. A. (2003). "Growth performance of pigs fed diets with and without tylosin phosphate supplementation and reared in a biosecure all-in all-out housing system." Can Vet J **44**(7): 571-6.

Wierup, M. (2001). "The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials." Microb Drug Resist **7**(2): 183-90.

## **3 Discussion générale des résultats.**

### **3.1 Performances zootechniques.**

Les promoteurs de croissance antimicrobiens sont généralement utilisés dans le but d'augmenter la rentabilité des élevages. Les effets leur étant attribués sont multiples, mais l'efficacité alimentaire, ou conversion alimentaire, et la santé globale des animaux (moins d'animaux malades ou sous le poids normal) sont certainement les plus importants du point de vue économique (Cromwell 1999; Close 2000; Bengtsson et Wierup 2006).

#### **3.1.1 Efficacité alimentaire**

Globalement, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes nourris avec des diètes supplémentées avec des promoteurs de croissance et le groupe témoin nourri avec la même moulée, mais sans aucun antibiotique ( $p=0,13$ , voir Table I). Les rapports récents sur l'efficacité des PC sur le gain de poids et l'efficacité alimentaire en général sont divisés. Certains rapportent des gains ou des effets adverses qui dépendent de l'administration de PC (Callesen 2002), d'autres ne notent pas de différences significatives (Van Lunen 2003). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de différences entre les groupes, telles que les mesures de biosécurité en vigueur dans les élevages, ainsi que la résistance bactérienne aux PC utilisés.

#### **Biosécurité**

Les mesures de biosécurité appliquées dans les bâtiments ayant servis à l'étude ont pu réduire l'exposition des animaux à certains microorganismes et donc pu prévenir certaines maladies. Entre autres, le personnel se rendant à la ferme a appliqué le changement de bottes et de survêtement lors de l'accès au site. Cela a pu empêcher, ou à tout le moins réduit, l'introduction de nouveaux microorganismes dans l'élevage. Un des mécanismes d'action proposés des PC est une inhibition de certains agents pathogènes, ce qui résulte en un système

immunitaire des animaux moins sollicité, et donc, moins de pertes énergétiques liées à l'activité du système (production d'anticorps, etc.). L'introduction de microorganismes pathogènes peut aussi entraîner des infections dans le troupeau, infections qui peuvent mener à des retards de croissance. Or, en l'absence de ces nouveaux agents pathogènes, il n'y a aucune sollicitation supplémentaire du système immunitaire des animaux, et aucune infection supplémentaire menant à des retards de croissance. Ces aspects peuvent être reliés à nos observations. Dans une étude similaire à la nôtre, Van Lunen (2003) conclue aussi que l'addition de tylosine n'améliore pas la conversion alimentaire. Par contre, Van Lunen (2003) ne mentionne pas si d'autres antibiotiques ont été utilisés en parallèle, et une utilisation thérapeutique d'antibiotiques a pu altérer les résultats par rapport à une utilisation exclusive de PC. Il est aussi important de mentionner que nos observations et celles de Van Lunen (2003) ont été faites durant la période de croissance-finition des porcs. On ne peut donc pas conclure que l'utilisation de PC est inutile dans d'autres phases de leur croissance, notamment durant le sevrage, où l'utilisation de tylosine semble bénéfique (Weber, Schinckel, Houseknecht *et al.* 2001).

Concernant la biosécurité, il serait aussi intéressant de considérer l'aspect économique du point de vue de la rentabilité. Il est bien évident que les mesures sanitaires mises en application dans notre étude (changements de bottes fréquents, désinfection du matériel entrant) sont associées à des coûts en matériel et en temps. Comme dans toute situation, plus on introduit de mesures, plus il en coûte cher pour obtenir des améliorations. L'étude de Van Lunen (2003) avait des mesures encore plus strictes que les nôtres (entrée contrôlée, douche requise pour les personnes ayant été en contact avec des porcs depuis moins de 48h), mais nous avons obtenu un résultat semblable pour la performance. Selon nos données, l'application de bonnes mesures de biosécurité semblent toutefois générer des résultats semblables à l'utilisation de PC.

### **Résistance aux PC utilisés**

Une autre hypothèse peut aussi venir expliquer l'absence de différence entre les groupes traités avec des antibiotiques et le groupe témoin en ce qui a

trait à l'efficacité alimentaire: la résistance des microorganismes ciblés (*E. coli* et *Enterococcus*) aux antibiotiques utilisés. Un des mécanismes postulé pour expliquer l'action des PC est l'inhibition de la croissance de certains microorganismes opportunistes. Ces microorganismes consomment des nutriments par leur croissance (des nutriments alors indisponibles pour l'hôte) et entraînent une dépense énergétique chez l'hôte (plusieurs grammes d'IgA, des anticorps, sont produits chaque jour par un porc adulte) (Dibner et Richards 2005). Comme il est démontré dans les Figures 1 et 2 de l'article, la plupart des *Enterococcus* présents dans les flores microbiennes étaient déjà hautement résistants à la virginiamycine (>256µg/ml) et la tylosine (>1024µg/ml) dès la première semaine. On peut aussi s'attendre à ce que d'autres espèces soient résistantes, les gènes de résistances étant souvent transférables (via des plasmides et des intégrons, entre autres) (Salyers, Shoemaker, Stevens *et al.* 1995; Werner, Hildebrandt, Klare *et al.* 2000). Par exemple, le transposon Tn917, qui contient des gènes, dont *ermB*, conférant une résistance de type MLS<sub>B</sub>, se retrouve chez plusieurs espèces de bactéries à Gram positif (Shaw et Clewell 1985; Puopolo, Klinzing, Lin *et al.* 2007). Comme la tylosine et la virginiamycine sont effectivement ciblées par la résistance MLS<sub>B</sub>, on peut supposer que Tn917, ou d'autres éléments semblables, ont pu jouer un rôle dans la résistance aux PC utilisés dans notre étude. Les espèces résistantes ont probablement été peu inhibées par les PC, et ont pu continuer à croître. Dans ce cas, la perte d'énergie attribuable à la présence de bactéries pathogènes aura été semblable dans les groupes nourris avec des PC et dans le groupe témoin. Cela pourrait donc expliquer l'absence de différence dans l'efficacité alimentaire. On ne peut cependant tirer des conclusions formelles puisque notre étude n'a porté que sur 2 espèces microbiennes et que la sensibilité aux PC des autres espèces reste à vérifier.

### 3.1.2 Maladie et mortalité

Lors des expériences, certains porcs ont été retirés pour cause de maladies diverses. Un porc devant recevoir des antibiotiques était retiré, car l'administration de ces substances aurait pu modifier la flore microbienne et les résultats obtenus auraient été faussés. L'analyse du nombre de porcs qui sont

décédés ou ont été retirés pour cause de maladie (dont l'arthrite et les maladies pulmonaires; les retards de croissance ont aussi été considérés comme des maladies) (Table II) a révélé que la présence des PC tylosine et VG n'a pas influencé les taux de mortalité ( $p=0,88$ ) ou de maladie ( $p=0,87$ ). Dans l'étude de Van Lunen (2003), la mortalité était aussi similaire entre des porcs ayant reçu de la tylosine et des porcs n'en ayant pas reçu, et le design était semblable au nôtre. Par contre, d'autres études ont rapporté une certaine hausse des maladies suite au retrait des promoteurs de croissance, notamment au Danemark. En effet, des hausses de maladies chez les porcelets ont été rapportées, dont les maladies gastro-intestinales causées par *E. coli* et *Lawsonia intercellularis* (Jensen 2006). On note aussi une hausse chez les porcs en croissance-finition, où on a observé des problèmes de maladies entériques dans 11% des élevages (Callesen 2002; Wegener 2002). Comme pour le gain de poids, les mesures de biosécurité strictes adoptées dans notre étude (ainsi que chez certains éleveurs), pourraient avoir favorisé la santé des animaux en leur épargnant d'être exposés à certains agents pathogènes.

### 3.1.3 Limitations statistiques

Il faut tout de même considérer que notre design expérimental a une portée statistique limitée, i.e. une marge d'erreur assez élevée. En effet avec 100 porcs dans chaque groupe pour chacun des 2 lots, il faut un grand écart entre deux groupes pour trouver une différence significative. Les groupes nourris avec de la tylosine ont une conversion alimentaire moyenne supérieure de 1,3% à celle du groupe témoin mais, compte tenu de la taille de l'échantillon utilisé, cette différence n'est pas significative (Table I). Pour une production commerciale, un gain de 1,3% sur le coût de la moulée serait considérable. Il faudrait donc vérifier avec un échantillon plus grand afin d'être certain qu'il n'y a pas une amélioration de l'efficacité alimentaire justifiant le coût des antibiotiques.

## 3.2 Résistance phénotypique

Si l'ajout de PC antimicrobiens dans la moulée animale a été si controversé par le passé, c'est que l'on a craint que l'exposition à ces produits favorise l'augmentation de l'antibiorésistance microbienne (Collignon 2004). Aujourd'hui, ces considérations sont toujours d'actualité, mais d'autres craintes se sont ajoutées. La résistance croisée envers des antibiotiques de la même classe que les PC est évidemment une préoccupation ; la virginiamycine et la tylosine utilisées dans notre étude sont de bons exemples, elles proviennent toutes deux de classes d'antibiotiques ayant des applications directes en médecine humaine (Karanika, Prati, Kiritsi *et al.* 2008). Plus récemment, ce sont les multirésistances qui sont apparues, par l'entremise d'éléments génétiques mobiles (Khemtong et Chuanchuen 2008). Ces multirésistances complexifient l'étude de l'impact des PC. En effet, il ne suffit plus de vérifier si, suite à l'utilisation d'un PC, on observe une hausse de la résistance envers ce même PC et envers les antibiotiques de la même classe ; l'utilisation de ce PC a pu aussi entraîner une hausse de la résistance envers des antibiotiques non apparentés à ce dernier, mais dont des gènes de résistance se trouvent sur un élément génétique transférable contenant également des gènes de résistance au PC (Klare, Konstabel, Badstubner *et al.* 2003). Dans ce cas, la pression sélective créée par l'utilisation du PC peut entraîner la propagation de l'élément génétique mobile, et donc des résistances y étant associées (Klare, Konstabel, Badstubner *et al.* 2003). Pour cette raison, il est important de vérifier quel est l'impact réel des PC i.e. s'ils causent des changements au niveau des phénotypes de résistance et, le cas échéant, lesquels.

### 3.2.1 *Escherichia coli*

*E. coli* est naturellement résistant aux antibiotiques hydrophobes et de masses moléculaire élevée (comme la tylosine et la virginiamycine, qui ciblent plutôt les bactéries à Gram positif) (Euzéby 2007). Il est donc intéressant d'observer à quel point ces molécules peuvent influencer les phénotypes de résistance. Table III montre les résultats obtenus quant aux phénotypes de

résistance des *E. coli* isolés des fèces recueillies au début et à la fin des expériences.

### 3.2.1.1 Groupe témoin

#### Baisse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps

On remarque tout d'abord que les *E. coli* provenant du groupe témoin n'ont pas connu beaucoup de changements dans leur phénotype de résistance. Comme les flores microbiennes sont des ensembles dynamiques qui vont changer durant la croissance des porcs, il était normal de s'attendre à des changements phénotypiques dans les résistances aux agents antimicrobiens. Les isolats du groupe témoin ont donc servi à établir une ligne de base en regard des changements auxquels on pouvait s'attendre sans aucun traitement. Dans le groupe témoin, seul le pourcentage d'isolats résistants à l'ampicilline a changé, diminuant significativement de la semaine 1 à la semaine 15, passant de 62,1% à 33,3% ; cette résistance est restée stable dans les autres groupes. Une étude récente a comparé les niveaux d'antibiorésistance de 35 fermes n'utilisant pas de PC et 60 fermes en utilisant (Bunner, Norby, Bartlett *et al.* 2007). On a, entre autres, trouvé que la résistance à l'ampicilline est significativement plus élevée dans les fermes utilisant des PC. La conclusion est la même dans une autre étude évaluant l'impact de l'utilisation de la tétracycline comme PC (Alexander, Yanke, Topp *et al.* 2008). La résistance à l'ampicilline est grandement reliée au gène plasmidique *bla*<sub>TEM-1</sub>, qui code pour une  $\beta$ -lactamase (Livermore, Moosdeen, Lindridge *et al.* 1986; Poole 2004). Il est donc raisonnable de penser que l'utilisation de PC a pu co-sélectionner pour la résistance à l'ampicilline si un plasmide contenant *bla*<sub>TEM-1</sub> contenait également des gènes de résistances aux PC utilisés. Les isolats ayant déjà ce plasmide ont évidemment aussi pu être sélectionnés avec le temps.

### 3.2.1.2 Groupe tylosine

#### Baisse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps

Lorsqu'on analyse les résultats de diffusion en disque sur agar pour les *E. coli* du groupe tylosine, le premier constat est la diminution du pourcentage des isolats résistants à l'érythromycine qui passe de 92,0% à la semaine 1 à 63,3% à la semaine 15. Comme la tylosine est un macrolide tout comme l'érythromycine, il est normal de s'attendre à une résistance croisée envers ce dernier antibiotique. Il existe cependant des hypothèses pouvant expliquer le phénomène inverse que nous observons.

Tout d'abord, les bacilles à Gram négatif comme *E. coli* sont naturellement résistants aux macrolides, souvent à faible concentration (Euzéby 2007). Cela est dû à une faible perméabilité membranaire vis-à-vis ces molécules. La tylosine était administrée à 44 ppm, ce qui est une faible dose. Il est très possible que cette faible concentration n'ait tout simplement pas affecté la croissance des *E. coli*, et que certaines souches non résistantes à l'érythromycine ont pu prendre de l'ampleur dans la population microbienne. Par contre, comme on n'a pas observé ce phénomène dans le groupe témoin, il faut aussi envisager d'autres explications que l'évolution naturelle de la flore microbienne, comme les différences moléculaires qui existent entre la tylosine et l'érythromycine.

La tylosine est un macrolide dont l'anneau macrolactone a 16 atomes de carbones, alors que l'érythromycine en a 14. Or, il a été démontré par certaines études que la tylosine et les autres macrolides à 16 carbones ne vont pas nécessairement induire une résistance de type MLS<sub>B</sub>, due, notamment, aux gènes *erm* (codant pour des méthylases) (Kamimiya et Weisblum 1997; Bailey, Chettiath et Mankin 2007). Donc, il est possible que l'exposition d'*E. coli* à la tylosine n'ait pas sélectionné de bactéries ayant un phénotype de résistance à l'érythromycine. Des mécanismes de résistance spécifiques à la tylosine ou aux

macrolides à 16 carbones sont peut-être à l'oeuvre, comme celui décrit par Liu et Douthwaite (2002).

Il existe d'ailleurs une résistance spécifique à la tylosine. Elle implique une méthylation aux nucléotides G748 et A2058 du site d'attachement des antibiotiques; c'est la disposition des sucres autour de la structure macrolactone de la tylosine qui l'empêche de se lier si ces nucléotides sont méthylés (Liu et Douthwaite 2002). Les gènes responsables de ces méthylations sont *rlmA*<sup>II</sup>, un homologue de *tlrB* (retrouvé chez *Streptomyces fradiae*, le microorganisme produisant la tylosine), et *tlrD* (tlr : tylosin resistance) (Douthwaite, Crain, Liu *et al.* 2004). Cette étude mentionne que ce mécanisme particulier ne confère pas de résistance à l'érythromycine, ce qui peut expliquer la baisse de la résistance ayant été observée envers cet antibiotique.

Finalement, il se peut aussi que certaines bactéries qui compétitionnent avec *E. coli* aient été affectées par la présence de tylosine, ce qui a pu provoquer des changements dans les ratios de prévalence de certaines des souches de *E. coli*.

### **Hausse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps**

La résistance à 4 antibiotiques a augmenté, soit le chloramphénicol (C), la néomycine (N), la kanamycine (K) et la céphalotine (KF).

Il n'est pas surprenant de constater une hausse de la résistance au chloramphénicol. Tout d'abord, il existe des pompes à efflux multidrogues agissant sur le chloramphénicol et les macrolides, comme la pompe AcrAB-TolC (Baucheron, Tyler, Boyd *et al.* 2004; Chollet, Chevalier, Bryskier *et al.* 2004). Une résistance croisée, due à une sélection des bactéries possédant cette pompe à efflux, est donc possible à ce niveau.

De plus, on a aussi trouvé chez *E. coli* le gène *acrD*, qui agit en conjonction avec des gènes de la pompe AcrAB-TolC, et qui sert de transporteur

dans l'efflux des aminoglycosides (Rosenberg, Ma et Nikaido 2000; Aires et Nikaido 2005). Cela peut donc expliquer les hausses de la résistance à la kanamycine et à la néomycine observées.

L'augmentation de la résistance à la céphalotine, une céphalosporine, est marquée, passant de 8,0% à 43,3%. Les céphalosporines sont des  $\beta$ -lactamines et les gènes de résistance à ces antibiotiques, codant pour des  $\beta$ -lactamases, sont fréquemment rencontrés sur des éléments génétiques mobiles (Philippon, Arlet et Jacoby 2002). On peut donc supposer qu'un de ces gènes a été acquis par un élément transportant aussi un gène de résistance à la tylosine. La littérature ne fait pas mention d'association entre des gènes de résistance à la céphalotine et les macrolides sur des éléments mobiles, mais on rapporte dans une étude qu'un autre PC, la chlortétracycline, a aussi entraîné une hausse de la résistance à cette céphalosporine (Wagner, Straw, Fedorka-Cray *et al.* 2008). Certaines souches de *E. coli* sont sensibles à la céphalotine, d'autres moins grâce à la production de céphalosporinases par des gènes chromosomiques (Euzéby 2007). Il est possible que ces gènes ont été co-sélectionnés s'ils se trouvaient sur le chromosome des *E. coli* qui ont été sélectionnés par la présence des gènes de résistance à la tylosine, comme *rlmA*<sup>II</sup>.

### 3.2.1.3 Groupe virginiamycine

#### Baisse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps

On observe dans le groupe virginiamycine une baisse de la résistance à la tétracycline (TE). La résistance à la tétracycline est très répandue chez *E. coli* dans les populations porcines, via les gènes *tet* (Enne, Cassar, Sprigings *et al.* 2007). Il est donc surprenant d'observer une baisse du nombre d'isolats résistants à cet antibiotique, surtout que les gènes *tet* sont souvent associés à d'autres gènes de résistance et sont donc co-sélectionnés. Dans une étude sur la résistance aux antibiotiques chez les porcs, on a trouvé que la résistance à de multiples antibiotiques était toujours associée à la résistance à la tétracycline (Lim, Lee, Nam *et al.* 2007). Il faut toutefois mentionner que la tétracycline est beaucoup plus utilisée en Corée que dans les autres pays industrialisés (Chong et

Lee 2000). Par contre, la tétracycline ne semble pas associée à la résistance à la virginiamycine ou aux streptogramines comme le sont l'érythromycine et le chloramphénicol (voir la section suivante). Il est possible que la sélection de gènes de résistance aux streptogramines se soit faite au détriment des microorganismes résistants à la tétracycline ne possédant pas ces derniers gènes.

### **Hausse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps**

On observe dans les isolats du groupe traité à la VG, une hausse du pourcentage d'isolats résistants au chloramphénicol (C), à l'érythromycine (E) et au sulfaméthoxazole (RL).

La résistance à l'érythromycine n'est pas surprenante. Comme la VG et l'érythromycine ont la même cible, A2058 de la sous-unité 23S du ribosome, on peut s'attendre à une résistance croisée, car la méthylation, via ErmB, par exemple, entraînera la résistance envers ces deux antibiotiques (Klare, Konstabel, Badstubner *et al.* 2003). De plus, il a été démontré que *E. coli* peut recevoir des gènes de résistance originant de bactéries à Gram positif, comme *Streptococcus* et *Enterococcus*, via des plasmides (Brisson-Noel, Arthur et Courvalin 1988). Des gènes comme *ermB* peuvent avoir été transféré via des transposons comme Tn917. L'exposition à la VG semble donc sélectionner pour la résistance à l'érythromycine.

Comme il a été mentionné plus haut, le chloramphénicol a une cible cellulaire très proche de celle des macrolides et des streptogramines. Il n'est donc pas surprenant que dans une étude récente, on ait mis à jour chez *E. coli* une ARNr méthyltransférase, Cfr, qui confère une résistance aux streptogramines de type A et aux phénicolés (Long, Poehlsgaard, Kehrenberg *et al.* 2006). La résistance est donc encore une fois conférée par une méthylation de l'ARNr sur la sous-unité 23S du ribosome, mais au nucléotide 2503. Il est donc possible que ce gène soit à l'origine de la résistance au chloramphénicol observée dans le groupe VG. Il est plausible de penser qu'une résistance croisée

au chloramphénicol dans ce groupe est due à une modification du site d'attachement de l'antibiotique qui favorise la résistance à la virginiamycine.

Il est aussi intéressant de mentionner le fait qu'un plasmide contenant le gène *vatE* et des gènes pratiquement identiques (99% d'homologie) à *cat* (*cat* : Chloramphénicol AcétylTransférase) et *ermB* a été découvert chez *Enterococcus* (Werner, Hildebrandt, Klare *et al.* 2000). *vatE* permet la résistance aux streptogramines, *cat* code pour une acétyltransférase qui confère la résistance au chloramphénicol et *ermB* confère une résistance de type MLS<sub>B</sub>. En prenant en compte que des *Enterococcus* ont été isolés des fèces porcines de notre étude, si ce plasmide était présent, il a pu être transféré à *E. coli* par *Enterococcus*, comme l'équipe de Brisson-Noel l'a démontré (Brisson-Noel, Arthur et Courvalin 1988), et cela aussi peut expliquer le phénotype de résistance observé pour le groupe traité avec la VG.

On remarque aussi une hausse significative de la résistance au sulfaméthoxazole dans le groupe VG, passant de 20,0% à 44,4%. On observe naturellement de hauts taux de résistance à cet antibiotique chez les porcs (Do, Cu, Nguyen *et al.* 2006; Grobbel, Lubke-Becker, Alesik *et al.* 2007). Une étude récente démontre qu'au Canada, la résistance au sulfaméthoxazole se propage surtout par transfert horizontal, par le biais des gènes *sul* (*sul1*, *sul2* et *sul3*) (Blahna, Zalewski, Reuer *et al.* 2006). On peut donc penser que ces gènes de résistances ont pu se propager sur des éléments génétiques mobiles contenant aussi des gènes de résistance aux streptogramines (Soge, Adeniyi et Roberts 2006).

#### 3.2.1.4 Sérotypie

Des analyses de sérotypie ont aussi été effectuées sur les isolats de *E. coli*. Les résultats (voir Table V), n'ont pas permis de conclure que les PC utilisés ont eu un effet de pression sélective qui a favorisé certains phénotypes, même si une légère tendance se dégage. Dans le groupe témoin, on a observé une hausse de la prévalence de l'antigène O115 entre la semaine 1 et la semaine

15 ; alors que l'antigène O2 était présent chez 8 isolats à la semaine 1, il n'y en avait plus un seul à la semaine 15. Le groupe témoin est l'unique groupe dans lequel on ait retrouvé un même sérotype au début et à la fin de l'expérience. En effet, aucun des sérotypes de la semaine 1 n'a été retrouvé à la semaine 15 autant dans le groupe tylosine que dans le groupe virginiamycine. Ces résultats suggèrent une grande variation dans la prévalence des divers sérotypes de *E. coli* dans les matières fécales de porcs. Le nombre d'isolats à l'étude est cependant faible, et ne permet pas d'apprécier les variations de sérotypes causés par l'usage des PC.

### 3.2.1.5 Synthèse

Les résultats de phénotypes de résistances obtenus chez *E. coli* suggèrent un certain rôle des PC dans la résistance aux antibiotiques. Un seul changement de prévalence de la résistance dans le groupe témoin montre une certaine stabilité des phénotypes pour cette espèce durant les 15 semaines de traitement. Du côté des groupes traités aux PC, on note environ quatre fois plus d'augmentation que de régression du nombre d'isolats résistants (7 contre 2). Comme les *E. coli* en général sont plutôt naturellement résistants aux PC utilisés (Euzéby 2007), une analyse des CMI entre la semaine 1 et la semaine 15 aurait été ici très utile afin de détecter d'éventuels changements dans la résistance à de fortes concentrations. On peut émettre l'hypothèse que les résistances ont été acquises par le biais d'éléments génétiques mobiles provenant d'espèces sensibles aux PC utilisés qui possédaient des gènes de résistance aux macrolides et aux streptogramines. Les résultats de sérotypie n'indiquent d'ailleurs pas non plus qu'il y a eu une pression sélective favorisant des phénotypes particuliers.

### 3.2.2 *Enterococcus*

Les 15 semaines de traitement ont provoqué beaucoup plus de changements dans les pourcentages d'isolats résistants chez *Enterococcus* que chez *E. coli*.

### 3.2.2.1 Groupe témoin

Les résultats (Table IV), laissent croire que les nombreux changements observés dans les phénotypes de résistance sont dus à la plus grande sensibilité d'*Enterococcus* aux PC utilisés, mais le fait est que même le groupe témoin a subi plusieurs changements. Les populations d'*Enterococcus* chez les porcs subissent donc des changements en ce qui a trait au pourcentage d'isolats résistants à certains antibiotiques, et ce, sans même être exposés à des antibiotiques. Dans ce cas, cela est probablement dû à des changements dans la microflore reliés à l'âge des porcs (Tannock 1997; Varel et Yen 1997).

#### Baisse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps

On note une baisse significative de la résistance envers l'apramycine (APR), la gentamycine (CN) et la kanamycine (K). Il est très intéressant de noter que tous ces antibiotiques font partie de la classe des aminoglycosides. Comme les aminoglycosides ciblent généralement les bactéries à Gram négatif, et sont plus efficaces contre elles (Price 1986), il est peu probable que les gènes de résistance à ces antibiotiques soient indispensables à *Enterococcus*. D'ailleurs on note que, même si elle a baissé, la résistance à ces 3 aminoglycosides demeure tout de même élevée (entre 50% et 80%). On sait aussi que certains gènes conférant une résistance élevée aux aminoglycosides (codant pour des enzymes modifiant les aminoglycosides), comme *aac(6')-aph(2'')* qui confère une grande résistance à la gentamycine et la kanamycine (Kobayashi, Alam, Nishimoto *et al.* 2001), sont des gènes acquis chez *Enterococcus*, via des plasmides et des transposons (Simjee et Gill 1997). On peut donc supposer que, alors que les porcs vieillissaient, les bactéries portant ces gènes ont diminué en prévalence dans la population des *Enterococcus*, et que les isolats résistants à la semaine 15 le sont en partie grâce à la résistance intrinsèque des *Enterococcus* aux aminoglycosides, ce qui explique que la résistance à ces antibiotiques reste relativement élevée. Il est aussi possible que ce changement dans la résistance soit dû à un changement dans les espèces, des études ayant démontré une plus grande résistance d'*E. faecium* aux aminoglycosides que celle exprimée par *E.*

*faecalis* (dans des isolats provenant d'humains) (Vazquez, Robledo, Arroyo *et al.* 2003). D'ailleurs, une étude rapporte que *E. faecium* pourrait diminuer en prévalence en absence d'ATB (Ramlachan, Anderson, Andrews *et al.* 2008).

### **Hausse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps**

On note pour le groupe témoin une hausse de la résistance envers l'ampicilline (AMP) et la céphalotine (KF). Ces deux antibiotiques sont des  $\beta$ -lactamines (pénicilline et céphalosporine, respectivement). Comme il a été mentionné dans la section précédente, les gènes de résistance (codant pour des  $\beta$ -lactamases) sont souvent portés par des éléments génétiques mobiles. En absence d'antibiotique, une hypothèse expliquant cette hausse est tout simplement une modification de la flore microbienne normale ayant favorisé certaines espèces porteuses des ces éléments génétiques mobiles. Ces espèces ont alors pu transférer leurs gènes aux *Enterococcus*, ce qui expliquerait la hausse du nombre d'isolats résistants. On peut aussi émettre l'hypothèse que les éléments génétiques mobiles portant les gènes de  $\beta$ -lactamases portaient également des gènes aidant la compétitivité de *Enterococcus* dans la flore microbienne des porcs.

#### **3.2.2.2 Groupe tylosine**

De tous les groupes, ce sont les *Enterococcus* provenant du groupe supplémenté avec la tylosine qui ont subi le plus de changements quant aux phénotypes de résistance.

### **Baisse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps**

Le groupe tylosine a connu une baisse du nombre d'isolats résistants envers l'ampicilline (AMP), le ciprofloxacine (CIP), l'enrofloxacine (ENR) et le triméthoprime/sulfas (SXT) à la semaine 15.

À première vue, il est étrange de constater une baisse de la résistance au triméthoprime/sulfas (de 13% à 0%) dans ce groupe alors qu'on observe une hausse de la résistance au sulfaméthoxazole (RL) dans le même groupe (voir prochaine section). En fait, il faut se rappeler que l'efficacité du triméthoprime/sulfas est reliée à une synergie entre les deux antibiotiques, i.e. que leur efficacité combinée est plus grande que la somme de leurs efficacités individuelles (Smilack 1999). Il est donc possible que si, par la modification de la flore microbienne, certains gènes conférant une résistance au triméthoprime diminuent en prévalence chez *Enterococcus* (et, à 13% de résistance initiale, la prévalence de ces gènes devait déjà être faible) la synergie entre ces deux antibiotiques soit encore plus efficace, et donc qu'aucun isolat d'*Enterococcus* ne résiste à leur action. Les mécanismes et les gènes de résistance au triméthoprime chez *Enterococcus* ne sont d'ailleurs pas totalement élucidés (Wisell, Kahlmeter et Giske 2008).

Le ciprofloxacine et l'enrofloxacine sont des antibiotiques de la classe des quinolones. L'enrofloxacine est utilisé exclusivement en médecine vétérinaire. Ces agents agissent en se liant à l'ADN durant la réplication et empêchent l'action de l'ADNgyrase et de la topoisomérase (la cible principale chez les bactéries à Gram positif comme *Enterococcus*) (Schmitz, Higgins, Mayer *et al.* 2002). Une explication possible est l'action des PC sur certaines espèces bactériennes compétitionnant avec *Enterococcus*, ce qui a pu favoriser certaines souches de cette bactérie. On sait d'ailleurs que certaines espèces d'*Enterococcus* sont plus sensibles que d'autres à ces agents. En 2005, Hershberger a évalué la résistance d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* au ciprofloxacine sur des fermes n'utilisant pas ces antibiotiques (Hershberger, Oprea, Donabedian *et al.* 2005). Il en est ressorti que 47% des *E. faecium* contre seulement 21% des *E. faecalis* y étaient résistants. La baisse de la résistance pourrait donc être due à un changement dans les espèces d'*Enterococcus*, d'*E. faecium* vers *E. faecalis*.

On note une baisse de la résistance à l'ampicilline dans le groupe tylosine. La résistance à l'ampicilline chez les *Enterococcus* est principalement due à la faible affinité de cet antibiotique pour leur «penicillin-binding protein». Les résistances plus élevées surviennent lorsqu'il y a des altérations dans le gène

*pbp5*, qui code pour la production de ces protéines, altérations qui diminuent encore plus l'affinité des pénicillines pour les PBP ou qui causent leur surexpression. La résistance à l'ampicilline est plus présente chez *E. faecium* que chez *E. faecalis*, et un changement dans les espèces vers *E. faecalis* a donc pu causer cette baisse du nombre d'isolats résistants (Williamson, Craft, Butts *et al.* 2002). Il est intéressant que cette conclusion soit identique à celle tirée de la baisse de la résistance au ciprofloxacine et à l'enrofloxacine. Une étude plus approfondie des espèces d'*Enterococcus* isolées des fèces animales permettrait de confirmer ces hypothèses.

### **Hausse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps**

Du côté des hausses significatives de résistance, on trouve le chloramphénicol (C), la gentamycine (CN) et le sulfaméthoxazole (RL).

Comme il a été mentionné dans la section *E. coli*, le chloramphénicol a une cible ribosomale très proche de celle des macrolides, et une méthylation de l'ARNr bactérien entraînant la résistance aux macrolides peut donc être liée à la résistance à ce phénicolé. Comme cela a été mentionné pour *E. coli*, étant donné que l'on a déjà retrouvé des plasmides portant des gènes homologues à *cat* (codant pour la chloramphénicol acétyl-transférase) et *ermB* (conférant une résistance aux macrolides), il est possible que l'exposition à la tylosine cosélectionne pour la résistance au chloramphénicol (Werner, Hildebrandt, Klare *et al.* 2000). On associe aussi la résistance au chloramphénicol à une baisse de perméabilité de la membrane cellulaire, mais il s'agit d'un mécanisme presque exclusif aux bactéries à Gram négatif (Nikaido 1998), ce qui n'est pas le cas d'*Enterococcus*.

La résistance à la gentamycine est aussi connue chez *Enterococcus* (Simjee 2006), et peut être acquise par transfert d'éléments génétiques mobiles (Takeuchi, Tomita, Fujimoto *et al.* 2005). Le transposon Tn5384, par exemple, découvert chez *Enterococcus faecalis* (Rice, Carias et Marshall 1995), confère la résistance à l'érythromycine (un macrolide semblable à la tylosine) et à la gentamycine. Sa présence pourrait donc expliquer la hausse de la résistance à la

gentamycine. Il existe aussi chez certaines bactéries à Gram positif des régions de multi-résistances contenant des gènes de résistance aux macrolides (*ermB*, *msrA*) couplés à des gènes de résistance aux aminoglycosides (*aac(6)*-*aph(2)*), qui pourraient expliquer une résistance croisée entre des antibiotiques de ces classes (Weigel, Donlan, Shin *et al.* 2007).

Il a été démontré que les gènes de résistance au sulfaméthoxazole sont transférables par transfert horizontal (Blahna, Zalewski, Reuer *et al.* 2006) et il ne semble pas y avoir beaucoup de liens entre la résistance à cet antibiotique et la résistance à la tylosine ou aux macrolides chez *Enterococcus*. La hausse du nombre de nos isolats résistants au sulfaméthoxazole est donc possiblement due à une résistance à cet antibiotique chez une autre espèce permettant un transfert horizontal des gènes vers les *Enterococcus*. La recherche des gènes de résistance aux sulfonamides *sul1*, *sul2* et *sul3*, qu'on a d'ailleurs retrouvés sur des plasmides d'isolats de *Salmonella* (Michael, Cardoso et Schwarz 2008) et de *E. coli* (Perreten et Boerlin 2003) provenant de porcs, pourrait clarifier la situation.

On pouvait s'attendre à une hausse du nombre d'isolats résistants à l'érythromycine par résistance croisée envers la tylosine. La hausse a été de 10%. La raison expliquant ce phénomène est simple : à la semaine 1, 90% des *Enterococcus* étaient déjà résistants. Il y a tout de même eu une hausse : 100% des isolats étaient résistants à l'érythromycine à la semaine 15, pour le groupe tylosine. Ce genre de taux de résistance, combiné à la CMI élevée de la plupart des isolats envers la tylosine, (voir Figure 1 de l'article) et la virginiamycine (voir Figure 2 de l'article), laisse supposer la présence de gènes tel que les *erm* (dont *ermB*), qui sont répandus chez l'espèce porcine et confèrent une résistance de type MLS<sub>B</sub>, ce qui résulte en une résistance élevée aux macrolides ainsi qu'en une résistance aux streptogramines. D'ailleurs, on remarque que la résistance à la quinupristine/dalfopriline, dans la classe des streptogramines, est aussi présente chez un grand nombre d'isolats d'*Enterococcus* (près de 75%). La recherche du gène *vatD*, codant pour la résistance aux streptogramines (dont la Q/D), par PCR chez les isolats d'*Enterococcus* provenant du deuxième essai de notre étude a d'ailleurs révélé que ce gène n'était pas présent (voir résultats dans l'Annexe 1), rend aussi la présence d'*ermB* plausible. Cela est en accord avec les

résultats d'une étude similaire (Jackson, Fedorka-Cray, Barrett *et al.* 2004). Jackson a étudié les effets de l'utilisation de tylosine sur la résistance à l'érythromycine dans une ferme A utilisant la tylosine comme PC, une ferme B l'utilisant en usage thérapeutique et une ferme C ne l'utilisant pas. On a trouvé que 60% des *Enterococcus* isolés de la ferme A étaient résistants à l'érythromycine alors que seulement 2% l'étaient dans la ferme témoin C. Dans notre étude, même les isolats du groupe témoin étaient très résistants à l'érythromycine (80%). Jackson a aussi trouvé que *ermB* était présent dans 95% des isolats résistants, toutes fermes confondues. *E. faecalis* était l'espèce la plus représentée dans les isolats résistants. Dans une autre étude, *ermB* a été recherché chez des *E. faecium* isolés de porcs et a été trouvé dans 98% d'entre-eux (n =62) (Donabedian, Perri, Vager *et al.* 2006). La recherche de ce gène dans les isolats de notre étude pourrait donc confirmer qu'il est l'un des gènes responsables de la résistance à l'érythromycine.

### 3.2.2.3 Groupe virginiamycine

Les *Enterococcus* isolés des porcs nourris avec un supplément de virginiamycine ont subi sensiblement autant de modifications dans les pourcentages de résistance que ceux isolés du groupe tylosine, mais on note une certaine ressemblance avec les phénotypes retrouvés dans les isolats du groupe témoin.

#### Baisse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps

On a noté plusieurs baisses du nombre d'isolats résistants dans le groupe virginiamycine : apramycine (APR), bacitracine (B), ciprofloxacine (CIP) et triméthoprime/sulfas (SXT).

La baisse de résistance à l'apramycine ne peut pas être directement liée à l'utilisation de la virginiamycine, car le groupe témoin a connu lui aussi une baisse du nombre d'isolats résistants. Il faut donc plutôt considérer cette baisse comme étant probablement liée à une évolution naturelle de la population d'*Enterococcus* selon l'âge des animaux (Tannock 1997; Varel et Yen 1997).

Comme dans le groupe tylosine, la prévalence des isolats résistants au triméthoprim/sulfas a diminuée. Peu d'études identifient chez *Enterococcus* sp. les gènes de résistance à cet antibiotique. On a, par contre, récemment identifié des intégrons portant des gènes de résistance au triméthoprim (*dhfr*XII, *dfr*A1) chez des *E. coli* et des *Salmonella* isolés de porcs (Vazquez, Robledo, Arroyo *et al.* 2003). Il existe d'ailleurs des études rapportant un transfert d'intégrons de bactéries entériques vers *Enterococcus* (Clark, Olsvik, Swenson *et al.* 1999). Il est donc possible que certains *Enterococcus* aient porté ces gènes au début des tests mais que leur prévalence ait diminué par la suite.

La baisse du nombre d'isolats résistants au ciprofloxacine peut s'expliquer par certaines caractéristiques des espèces d'*Enterococcus*. En effet, *E. faecalis* possède une résistance intrinsèque aux streptogramines A (dont fait partie la virginiamycine S) (Singh, Weinstock et Murray 2002) mais est plus sensible au ciprofloxacine (Williamson, Craft, Butts *et al.* 2002). Il est donc possible que des variations dans la prévalence de certaines souches d'*Enterococcus* aient altéré le pourcentage d'isolats résistants au ciprofloxacine.

### **Hausse du pourcentage d'isolats résistants dans le temps**

Du côté des hausses de résistance dans le groupe traité à la VG, on trouve une hausse aux antibiotiques ampicilline (AMP) et céphalotine (KF). On ne peut cependant pas lier ces hausses de résistance directement à l'utilisation de la VG, car la résistance à ces  $\beta$ -lactamines a aussi augmenté dans les isolats du groupe témoin. Les mêmes hypothèses expliquant ces changements dans le groupe témoin peuvent être appliquées pour le groupe VG. En fait, le portrait des hausses de résistance est identique dans le groupe témoin. On peut donc tirer de ce fait la conclusion que la présence de VG comme PC dans la moulée ne cause pas d'augmentation phénotypique de l'antibiorésistance chez les *Enterococcus* isolés de porcs; les variations peuvent être attribuables à la modification de la flore durant la croissance des animaux (Tannock 1997; Varel et Yen 1997).

#### 3.2.2.4 Synthèse

Sur la vingtaine d'antibiotiques testés par diffusion en disque sur gélose, des variations significatives (hausse ou baisse) du nombre d'isolats d'*Enterococcus* résistants sont observées entre la semaine 1 et la semaine 15. Il existe bien sûr des liens entre certains gènes de résistance à ces antibiotiques et les gènes de résistance aux PC utilisés, mais il paraît bien peu probable que des éléments génétiques mobiles soient les seuls responsables de tous les changements, tellement ceux-ci sont diversifiés. L'hypothèse selon laquelle les flores microbiennes aient été modifiées par une pression sélective due aux PC semble raisonnable comme en font foi les conclusions tirées sur la diminution des résistances aux quinolones, ciprofloxacine et enrofloxacine dans les groupes ayant reçu des PC.

D'ailleurs, en analysant les résultats obtenus, une tendance est apparue quant au nombre de résistances chez les isolats provenant des groupes supplémentés aux PC. En effet, dans le groupe témoin, le nombre de résistances par isolat est relativement étendu sur une grande plage, entre 8 et 17 résistances par isolats, et le portrait ne change à peu près pas entre la semaine 1 et la semaine 15 (ces nombres comprennent évidemment les résistances intrinsèques des *Enterococcus* envers plusieurs des antibiotiques testés). Le portrait est tout autre pour les groupes tylosine et virginiamycine. En effet, bien que la répartition du nombre de résistance dans ces groupes soit similaire au groupe témoin à la semaine 1, plus de 60% des isolats sont résistants à 12 ou 13 antibiotiques à la semaine 15. Cela ne représente aucunement une augmentation ou une diminution du nombre net de résistances par isolat, mais bien une concentration des isolats dans un phénotype particulier. Cela renforce donc l'hypothèse selon laquelle, dans cet essai, les PC ont pu exercer une pression sélective dans les populations microbiennes et favoriser certaines espèces d'*Enterococcus*.

### 3.3 Concentrations minimales inhibitrices des promoteurs de croissance.

Les CMI effectuées sur les isolats d'*Enterococcus* ont révélé des informations intéressantes, mais sans fournir d'informations sur l'action de la tylosine et de la virginiamycine. Dans le cas des groupes traités avec la tylosine et la virginiamycine, si la résistance initiale des isolats avait été faible et la résistance finale avait été forte, on aurait pu conclure que l'utilisation de ces PC entraîne une hausse de la résistance à leur endroit. Mais, comme le montrent la Figure 1 et la Figure 2 de l'article, la plupart des isolats étaient résistants aux plus hautes concentrations testées pour les deux PC (1024 µg/mL pour la tylosine et 256 µg/mL pour la virginiamycine), et cela à la semaine 1 comme à la semaine 15. Le gène *ermB* pourrait être responsable d'une partie de ces résistances (du fait qu'il confère une résistance de type MLS<sub>B</sub> et qu'il est retrouvé fréquemment dans les isolats porcins) mais d'autres mécanismes de résistance sont probablement aussi présents, dont les 2 monométhylations sur le ribosome bactérien conférant une résistance élevée à la tylosine décrites par Douthwaite (Liu et Douthwaite 2002; Douthwaite, Crain, Liu *et al.* 2004). L'analyse génétique des résistances pourra donc identifier les gènes responsables de ces CMI très élevées.

## 4 Conclusions

À la lumière des résultats obtenus dans l'étude, il est possible de conclure que dans des conditions d'élevage appliquant de bonnes pratiques d'hygiène et de biosécurité, l'ajout des promoteurs de croissance tylosine et virginiamycine dans l'alimentation des porcs en croissance-finition :

n'entraîne pas une augmentation significative de la conversion alimentaire dans ces élevages ;

n'entraîne pas une baisse significative des maladies ou de la mortalité dans ces élevages ;

modifie les patrons de résistance des *E. coli* et *Enterococcus* sp. présents dans ces élevages ;

entraîne une hausse du nombre de résistances aux antibiotiques chez les *E. coli* présents dans ces élevages

n'entraîne pas une hausse significative du nombre de résistances aux antibiotiques chez les *Enterococcus* sp. présents dans ces élevages ;

cause une pression sélective chez les *Enterococcus* sp. présents dans ces élevages.

De plus, dans l'élevage testé, dès l'arrivée des porcs au site de l'expérience, les *Enterococcus* sp. présents chez les porcs étaient déjà hautement résistants aux promoteurs de croissance tylosine et virginiamycine.

Des études moléculaires complémentaires seraient intéressantes afin de mieux comprendre cette évolution des flores microbiennes, et des gènes de résistance impliqués, en présence de PC.

## 5 Références

Aarestrup, F. M., Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen et L. B. Jensen (2000). "Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark." Diagn Microbiol Infect Dis **37**(2): 127-37.

Aarestrup, F. M., F. Bager, N. E. Jensen, M. Madsen, A. Meyling et H. C. Wegener (1998). "Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark." Apmis **106**(6): 606-22.

Aarestrup, F. M. et B. Carstensen (1998). "Effect of tylosin used as a growth promoter on the occurrence of macrolide-resistant enterococci and staphylococci in pigs." Microb Drug Resist **4**(4): 307-12.

Aarestrup, F. M., H. Hasman, L. B. Jensen, M. Moreno, I. A. Herrero, L. Dominguez, M. Finn et A. Franklin (2002). "Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries." Appl Environ Microbiol **68**(8): 4127-9.

Aires, J. R. et H. Nikaido (2005). "Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(6): 1923-9.

Alexander, T. W., L. J. Yanke, E. Topp, M. E. Olson, R. R. Read, D. W. Morck et T. A. McAllister (2008). "Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle." Appl Environ Microbiol **74**(14): 4405-16.

Allignet, J., V. Loncle, P. Mazodier et N. el Solh (1988). "Nucleotide sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vgb*, encoding a hydrolase

inactivating the B components of virginiamycin-like antibiotics." Plasmid **20**(3): 271-5.

Angulo, F. J., V. N. Nargund et T. C. Chiller (2004). "Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51**(8-9): 374-9.

APVMA (2004). Findings of the reconsideration of the registration of products containing virginiamycin, and their labels. Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority Accédé le 2008-10-18. [http://www.apvma.gov.au/chemrev/downloads/virginiamycin\\_findings.pdf](http://www.apvma.gov.au/chemrev/downloads/virginiamycin_findings.pdf).

Arthur, M., P. Reynolds et P. Courvalin (1996). "Glycopeptide resistance in enterococci." Trends Microbiol **4**(10): 401-7.

Bager, F., M. Madsen, J. Christensen et F. M. Aarestrup (1997). "Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms." Prev Vet Med **31**(1-2): 95-112.

Bailey, M., T. Chettiath et A. S. Mankin (2007). "Induction of *erm*(C) expression by 'non-inducing' antibiotics." Antimicrob Agents Chemother.

Baltch, A. L., L. H. Bopp, R. P. Smith, P. B. Michelsen et W. J. Ritz (2005). "Antibacterial activities of gemifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and erythromycin against intracellular *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in human monocytes." J Antimicrob Chemother **56**(1): 104-9.

Barton, M. (2000). "Antibiotic use in animals feed and its impact on human health." Nut Res Rev **13**: 279-299.

Bates, J. (1997). "Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection." J Hosp Infect **37**(2): 89-101.

Bates, J., J. Z. Jordens et D. T. Griffiths (1994). "Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man." J Antimicrob Chemother **34**(4): 507-14.

Baucheron, S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla et A. Cloeckaert (2004). "AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3729-35.

Bengtsson, B. et M. Wierup (2006). "Antimicrobial resistance in Scandinavia after ban of antimicrobial growth promoters." Anim Biotechnol **17**(2): 147-56.

Biavasco, F., G. Foglia, C. Paoletti, G. Zandri, G. Magi, E. Guaglianone, A. Sundsfjord, C. Pruzzo, G. Donelli et B. Facinelli (2007). "VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants." Appl Environ Microbiol **73**(10): 3307-19.

Blahna, M. T., C. A. Zalewski, J. Reuer, G. Kahlmeter, B. Foxman et C. F. Marrs (2006). "The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada." J Antimicrob Chemother **57**(4): 666-72.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau et Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-74.

Boerlin, P., A. Wissing, F. M. Aarestrup, J. Frey et J. Nicolet (2001). "Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs." J Clin Microbiol **39**(11): 4193-5.

Bogaard, A. E. v. d. (2000). "Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans." International Journal of Antimicrobial Agents **14**: 327-335.

Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts et M. R. Mulvey (2001). "Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona." J Bacteriol **183**(19): 5725-32.

Bozdogan, B. et R. Leclercq (1999). "Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium*." Antimicrob Agents Chemother **43**(11): 2720-5.

Brisson-Noel, A., M. Arthur et P. Courvalin (1988). "Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*." J Bacteriol **170**(4): 1739-45.

Bunner, C. A., B. Norby, P. C. Bartlett, R. J. Erskine, F. P. Downes et J. B. Kaneene (2007). "Prevalence and pattern of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolated from pigs reared under antimicrobial-free and conventional production methods." J Am Vet Med Assoc **231**(2): 275-83.

C.B.I.P. (2008). Macrolides. Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique. Accédé le 2008-10-28, [http://www.cbip.be/ggr/index.cfm?ggrWelk=/nindex/ggr/merk/MP\\_E.cfm](http://www.cbip.be/ggr/index.cfm?ggrWelk=/nindex/ggr/merk/MP_E.cfm).

Callesen, J. (2002). Effects of termination of AGP use on pigwelfare and productivity. International Invitational Symposium: Beyond Antibiotic Growth Promoters in Food Production. Foulum, Danemark.

Capitano, B. N., C. H. (2001). "Optimizing antimicrobial therapy through use of pharmacokinetic/pharmacodynamic principles." Mediguide to Infectious Diseases **21**: 1-8.

Casewell, M., C. Friis, E. Marco, P. McMullin et I. Phillips (2003). "The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health." J Antimicrob Chemother **52**(2): 159-61.

CÉE (1999). Commission Regulation of Amending Council Directive 70/524/DEC Concerning Additives in Feedingstuffs as Regards Withdrawal of Authorization of Certain Antibiotics. C. Européenne.

Cervantes, H. (2004). Why responsible antibiotic use enhances animal and human health. Midwest Poultry Federation Convention, St. Paul, MN.

Chinali, G., P. Moureau et C. G. Cocito (1984). "The action of virginiamycin M on the acceptor, donor, and catalytic sites of peptidyltransferase." J Biol Chem **259**(15): 9563-8.

Chinali, G., E. Nyssen, M. Di Giambattista et C. Cocito (1988). "Action of erythromycin and virginiamycin S on polypeptide synthesis in cell-free systems." Biochim Biophys Acta **951**(1): 42-52.

Chollet, R., J. Chevalier, A. Bryskier et J. M. Pages (2004). "The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **48**(9): 3621-4.

Chong, Y. et K. Lee (2000). "Present situation of antimicrobial resistance in Korea." J Infect Chemother **6**(4): 189-95.

Chow, J. W. (2000). "Aminoglycoside resistance in enterococci." Clin Infect Dis **31**(2): 586-9.

Clark, N. C., O. Olsvik, J. M. Swenson, C. A. Spiegel et F. C. Tenover (1999). "Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*." Antimicrob Agents Chemother **43**(1): 157-60.

Clewell, D. B., S. E. Flannagan et D. D. Jaworski (1995). "Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons." Trends Microbiol **3**(6): 229-36.

Close, W. H. (2000). "Producing pigs without antibiotic growth promoters." Adv Pork Prod **11**: 47-56.

Cocito, C. (1979). "Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components." Microbiol Rev **43**(2): 145-92.

Collier, C. T., M. R. Smiricky-Tjardes, D. M. Albin, J. E. Wubben, V. M. Gabert, B. Deplancke, D. Bane, D. B. Anderson et H. R. Gaskins (2003). "Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters." J Anim Sci **81**(12): 3035-45.

Collignon, P. (2004). "Antibiotic growth promoters." J Antimicrob Chemother **54**(1): 272; author reply 276-8.

Couper, A., L. Cromie, S. Neeve, P. Pommier, A. Keita et E. Pagot (2006). "Treatment of pneumonia in pigs with long-acting injectable tylosin." Vet Rec **159**(24): 805-7.

Courvalin, P. (2006). "Vancomycin resistance in gram-positive cocci." Clin Infect Dis **42 Suppl 1**: S25-34.

Croft, A., T. Duffield, P. Menzies, K. Leslie, R. Bagg et P. Dick (2000). "The effect of tilmicosin administered to ewes prior to lambing on incidence of clinical mastitis and subsequent lamb performance." Can Vet J **41**(4): 306-11.

Cromwell, G. L. (1999). Subtherapeutic use of antibiotics for swine: performance, reproductive efficiency and safety issues. Young Swine Conf.

Cundliffe, E., N. Bate, A. Butler, S. Fish, A. Gandecha et L. Merson-Davies (2001). "The tylosin-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*." Antonie Van Leeuwenhoek **79**(3-4): 229-34.

Davies, R. et T. A. Roberts (1999). "Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from commercial swine carcasses: effect of feed additives." Lett Appl Microbiol **29**(5): 327-33.

Dawson, R. J. et K. P. Locher (2006). "Structure of a bacterial multidrug ABC transporter." Nature **443**(7108): 180-5.

Dewey, C. E., B. D. Cox, B. E. Straw, E. J. Bush et H. S. Hurd (1997). "Associations between off-label feed additives and farm size, veterinary consultant use, and animal age." Prev Vet Med **31**(1-2): 133-46.

Dibner, J. J. et J. D. Richards (2005). "Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action." Poult Sci **84**(4): 634-43.

Do, N. T., H. P. Cu, N. N. Nguyen, X. H. Nguyen, X. T. Au, T. H. Van, N. Q. Vu et D. J. Trott (2006). "Antimicrobial resistance phenotypes of ETEC isolates from piglets with diarrhea in North Vietnam." Ann N Y Acad Sci **1081**: 543-5.

Donabedian, S., L. A. Thal, P. Bozigar, T. Zervos, E. Hershberger et M. Zervos (2003). "Antimicrobial resistance in swine and chickens fed virginiamycin for growth promotion." J Microbiol Methods **55**(3): 739-43.

Donabedian, S. M., M. B. Perri, D. Vager, E. Hershberger, P. Malani, S. Simjee, J. Chow, E. N. Vergis, R. R. Muder, K. Gay, F. J. Angulo, P. Bartlett et M. J. Zervos (2006). "Quinupristin-dalfopristin resistance in *Enterococcus faecium* isolates from humans, farm animals, and grocery store meat in the United States." J Clin Microbiol **44**(9): 3361-5.

Douthwaite, S., P. F. Crain, M. Liu et J. Poehlsgaard (2004). "The tylosin-resistance methyltransferase RlmA(II) (TlrB) modifies the N-1 position of 23S rRNA nucleotide G748." J Mol Biol **337**(5): 1073-7.

Dritz, S. S., M. D. Tokach, R. D. Goodband et J. L. Nelssen (2002). "Effects of administration of antimicrobials in feed on growth rate and feed efficiency of pigs in multisite production systems." J Am Vet Med Assoc **220**(11): 1690-5.

Dunlop, R. H., S. A. McEwen, A. H. Meek, R. M. Friendship, W. D. Black et R. C. Clarke (1999). "Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs." Epidemiol Infect **122**(3): 485-96.

DuPont, H. L. et J. H. Steele (1987). "Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health." Rev Infect Dis **9**(3): 447-60.

Elkins, C. A. et H. Nikaido (2002). "Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops." J Bacteriol **184**(23): 6490-8.

Enne, V. I., C. Cassar, K. Sprigings, M. J. Woodward et P. M. Bennett (2007). "A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter." FEMS Microbiol Lett.

Ethelberg, S., G. Sorensen, B. Kristensen, K. Christensen, L. Krusell, A. Hempel-Jorgensen, A. Perge et E. M. Nielsen (2007). "Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005." Epidemiol Infect **135**(6): 900-7.

Euzéby, J. P. (2007). Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. <http://www.bacteriologie.net/generale/resistanceantibiotiques.html> Accédé le 26/10/2007.

Florea, N. F. et C. H. Nightingale (2004). "Review of the pharmacodynamics of antibiotic use in animal food production." Diagn Microbiol Infect Dis **49**(2): 105-8.

Fone, D. L. et R. M. Barker (1994). "Associations between human and farm animal infections with *Salmonella* Typhimurium DT104 in Herefordshire." Commun Dis Rep CDR Rev **4**(11): R136-40.

Frankel, W. L., W. Zhang, A. Singh, D. M. Klurfeld, S. Don, T. Sakata, I. Modlin et J. L. Rombeau (1994). "Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon." Gastroenterology **106**(2): 375-80.

Fridkin, S. K., J. R. Edwards, S. C. Pichette, E. R. Pryor, J. E. McGowan, Jr., F. C. Tenover, D. H. Culver et R. P. Gaynes (1999). "Determinants of vancomycin use in adult intensive care units in 41 United States hospitals." Clin Infect Dis **28**(5): 1119-25.

Frost, L. S., K. Ippen-Ihler et R. A. Skurray (1994). "Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor." Microbiol Rev **58**(2): 162-210.

Gaastra, W. et F. K. de Graaf (1982). "Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains." Microbiol Rev **46**(2): 129-61.

Garrigues, B. (2002). "[Synercid emergency prescription program. The French experience]." Presse Med **31**(7): 297-301.

Gaskins, H. R. (2001). Intestinal bacteria and their influence on swine growth. Swine Nutrition. A. J. L. a. L. L. Southern. Boca Raton, FL, CRC Press: 585-608.

Gaskins, H. R., C. T. Collier et D. B. Anderson (2002). "Antibiotics as growth promotants: mode of action." Anim Biotechnol **13**(1): 29-42.

Giraudel, J. M., A. Diquelou, V. Laroute, P. Lees et P. L. Toutain (2005). "Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of NSAIDs in a model of reversible inflammation in the cat." Br J Pharmacol **146**(5): 642-53.

Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar et F. J. Angulo (1998). "Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States." N Engl J Med **338**(19): 1333-8.

Grave, K., V. F. Jensen, K. Odensvik, M. Wierup et M. Bangen (2006). "Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use." Prev Vet Med **75**(1-2): 123-32.

Grobbel, M., A. Lubke-Becker, E. Alesik, S. Schwarz, J. Wallmann, C. Werckenthin et L. H. Wieler (2007). "Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **120**(9-10): 391-401.

Guerra, B., S. Soto, R. Helmuth et M. C. Mendoza (2002). "Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes." Antimicrob Agents Chemother **46**(9): 2977-81.

Heitzman, R. J. (1979). "The efficacy and mechanism of action of anabolic agents as growth promoters in farm animals." J Steroid Biochem **11**(1C): 927-30.

Hershberger, E., S. Donabedian, K. Konstantinou et M. J. Zervos (2004). "Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology." Clin Infect Dis **38**(1): 92-8.

Hershberger, E., S. F. Oprea, S. M. Donabedian, M. Perri, P. Bozigar, P. Bartlett et M. J. Zervos (2005). "Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin." J Antimicrob Chemother **55**(1): 127-30.

Jackson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, J. B. Barrett et S. R. Ladely (2004). "Effects of tylosin use on erythromycin resistance in enterococci isolated from swine." Appl Environ Microbiol **70**(7): 4205-10.

Jensen, H. M. (2006). "Health management with reduced antibiotic use - experiences of a Danish pig vet." Anim Biotechnol **17**(2): 189-94.

Jensen, V. F., L. Jakobsen, H. D. Emborg, A. M. Seyfarth et A. M. Hammerum (2006). "Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*." J Antimicrob Chemother **58**(1): 101-7.

JETACAR (1999). The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans. Report of the Joint Expert Technical advisory Committee on Antibiotic Resistance (JETACAR), Commonwealth of Australia.

Jett, B. D., M. M. Huycke et M. S. Gilmore (1994). "Virulence of enterococci." Clin Microbiol Rev **7**(4): 462-78.

Johnson, A. P., L. Burns, N. Woodford, E. J. Threlfall, J. Naidoo, E. M. Cooke et R. C. George (1994). "Gentamicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* encoded by genes of veterinary origin." J Med Microbiol **40**(3): 221-6.

Kamimiya, S. et B. Weisblum (1997). "Induction of *ermSV* by 16-membered-ring macrolide antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **41**(3): 530-4.

Karanika, M., A. Prati, M. Kiritsi, I. Spiliopoulou, I. Neonakis, M. Anifantaki et E. Petinaki (2008). "Reduced susceptibility to

quinupristin/dalfopristin in *Enterococcus faecium* in Greece without prior exposure to the agent." Int J Antimicrob Agents **31**(1): 55-7.

Kelly, D. et T. P. King (2001). Luminal bacteria: Regulation of gut function and immunity. K. E. B. K. A. Piva, and J. E. Lindberg. Nottingham, UK, Nottingham University Press: 113-131.

Khemtong, S. et R. Chuanchuen (2008). "Class 1 integrons and *Salmonella* genomic island 1 among *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine." Microb Drug Resist **14**(1): 65-70.

Kirst, H. A., D. G. Thompson et T. I. Nicas (1998). "Historical yearly usage of vancomycin." Antimicrob Agents Chemother **42**(5): 1303-4.

Klare, I., C. Konstabel, D. Badstubner, G. Werner et W. Witte (2003). "Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*." Int J Food Microbiol **88**(2-3): 269-90.

Klevens, R. M., M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey et S. K. Fridkin (2007). "Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States." Jama **298**(15): 1763-71.

Kobayashi, N., M. Alam, Y. Nishimoto, S. Urasawa, N. Uehara et N. Watanabe (2001). "Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*." Epidemiol Infect **126**(2): 197-204.

Leclercq, R. et P. Courvalin (1997). "Resistance to glycopeptides in enterococci." Clin Infect Dis **24**(4): 545-54; quiz 555-6.

Lester, C. H., N. Frimodt-Moller, T. L. Sorensen, D. L. Monnet et A. M. Hammerum (2006). "In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human

origin in the intestines of human volunteers." Antimicrob Agents Chemother **50**(2): 596-9.

Lim, S. K., H. S. Lee, H. M. Nam, Y. S. Cho, J. M. Kim, S. W. Song, Y. H. Park et S. C. Jung (2007). "Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004." Int J Food Microbiol **116**(2): 283-6.

Liu, M. et S. Douthwaite (2002). "Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14658-63.

Liu, M., F. Kirpekar, G. P. Van Wezel et S. Douthwaite (2000). "The tylosin resistance gene *tlrB* of *Streptomyces fradiae* encodes a methyltransferase that targets G748 in 23S rRNA." Mol Microbiol **37**(4): 811-20.

Livermore, D. M., F. Moosdeen, M. A. Lindridge, P. Kho et J. D. Williams (1986). "Behaviour of TEM-1 beta-lactamase as a resistance mechanism to ampicillin, mezlocillin and azlocillin in *Escherichia coli*." J Antimicrob Chemother **17**(2): 139-46.

Long, K. S., J. Poehlsgaard, C. Kehrenberg, S. Schwarz et B. Vester (2006). "The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **50**(7): 2500-5.

Lorenz, M. G. et W. Wackernagel (1994). "Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment." Microbiol Rev **58**(3): 563-602.

Luna, V. A., P. Coates, E. A. Eady, J. H. Cove, T. T. Nguyen et M. C. Roberts (1999). "A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes." J Antimicrob Chemother **44**(1): 19-25.

MAPAQ (2007). Portrait économique de la production porcine <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Productions/Production/porcine/PortraitProductionporcine/> Accédé le 2008-10-31.

Mathew, A. G., K. N. Garner, P. D. Ebner, A. M. Saxton, R. E. Clift et S. Liamthong (2005). "Effects of antibiotic use in sows on resistance of *E. coli* and *Salmonella enterica* Typhimurium in their offspring." Foodborne Pathog Dis 2(3): 212-20.

Mathew, A. G., W. G. Upchurch et S. E. Chattin (1998). "Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms." J Anim Sci 76(2): 429-34.

Mazzariol, A., Y. Tokue, T. M. Kanegawa, G. Cornaglia et H. Nikaido (2000). "High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA." Antimicrob Agents Chemother 44(12): 3441-3.

McDougall, S., K. E. Agnew, R. Cursons, X. X. Hou et C. R. Compton (2007). "Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle." J Dairy Sci 90(2): 779-89.

Meunier, D., D. Boyd, M. R. Mulvey, S. Baucheron, C. Mammina, A. Nastasi, E. Chaslus-Dancla et A. Cloeckert (2002). "*Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in serotype paratyphi B." Emerg Infect Dis 8(4): 430-3.

Michael, G. B., M. Cardoso et S. Schwarz (2008). "Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron." Int J Antimicrob Agents 32(2): 120-9.

Muirhead, S. (2002). "Therapeutic use of antibiotics on rise in Denmark." Feedstuffs 74: 1-5.

Nagaraja, T. G., Y. Sun, N. Wallace, K. E. Kemp et C. J. Parrott (1999). "Effects of tylosin on concentrations of *Fusobacterium necrophorum* and fermentation products in the rumen of cattle fed a high-concentrate diet." Am J Vet Res **60**(9): 1061-5.

Nightingale, C. H., Murakawa, T. & Ambrose, P. G (2001). Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice. New York, NY, USA, Marcel Dekker Inc.

Nikaido, H. (1998). "The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access?" Drug Resist Updat **1**(2): 93-8.

Nikaido, H. et M. Vaara (1985). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability." Microbiol Rev **49**(1): 1-32.

NNIS (2000). "National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992-April 2000, issued June 2000." Am J Infect Control **28**(6): 429-48.

Noguchi, N., A. Emura, H. Matsuyama, K. O'Hara, M. Sasatsu et M. Kono (1995). "Nucleotide sequence and characterization of erythromycin resistance determinant that encodes macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **39**(10): 2359-63.

Noguchi, N., J. Katayama et K. O'Hara (1996). "Cloning and nucleotide sequence of the *mphB* gene for macrolide 2'-phosphotransferase II in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **144**(2-3): 197-202.

Okoh, A. I. et A. N. Osode (2008). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): a recurring decimal in infants' and travelers' diarrhea." Rev Environ Health **23**(2): 135-48.

Orskov, F. et I. Orskov (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. Methods in microbiology. T. B. a. J. R. Norris. London, Academic Press. **14**: 44-112.

Ouellette, M., D. Legare et B. Papadopoulou (1994). "Microbial multidrug-resistance ABC transporters." Trends Microbiol **2**(10): 407-11.

Ounissi, H. et P. Courvalin (1985). "Nucleotide sequence of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*." Gene **35**(3): 271-8.

Perreten, V. et P. Boerlin (2003). "A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland." Antimicrob Agents Chemother **47**(3): 1169-72.

Philippon, A., G. Arlet et G. A. Jacoby (2002). "Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **46**(1): 1-11.

Phillips, I. (2007). "Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health." Int J Antimicrob Agents **30**(2): 101-7.

Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston et J. Waddell (2004). "Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data." J Antimicrob Chemother **53**(1): 28-52.

Ploy, M. C., T. Lambert, J. P. Couty et F. Denis (2000). "Integrins: an antibiotic resistance gene capture and expression system." Clin Chem Lab Med **38**(6): 483-7.

Poole, K. (2004). "Resistance to beta-lactam antibiotics." Cell Mol Life Sci **61**(17): 2200-23.

Poppe, C., N. Smart, R. Khakhria, W. Johnson, J. Spika et J. Prescott (1998). "*Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen." Can Vet J **39**(9): 559-65.

Porter, R. D. (1988). Modes of gene transfer in bacteria. Genetic recombination. R. Kucherlapi. Washington, DC, American Society for Microbiology: 1-42.

Portillo, A., F. Ruiz-Larrea, M. Zarazaga, A. Alonso, J. L. Martinez et C. Torres (2000). "Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp." Antimicrob Agents Chemother **44**(4): 967-71.

Price, K. E. (1986). "Aminoglycoside research 1975-1985: prospects for development of improved agents." Antimicrob Agents Chemother **29**(4): 543-8.

Puopolo, K. M., D. C. Klinzing, M. P. Lin, D. L. Yesucevitz et M. J. Cieslewicz (2007). "A composite transposon associated with erythromycin and clindamycin resistance in group B *Streptococcus*." J Med Microbiol **56**(Pt 7): 947-55.

Ramlachan, N., R. C. Anderson, K. Andrews, R. B. Harvey et D. J. Nisbet (2008). "A comparative study on the effects of tylosin on select bacteria during continuous flow culture of mixed populations of gut microflora derived from a feral and a domestic pig." Foodborne Pathog Dis **5**(1): 21-31.

Rice, L. B., L. L. Carias et S. H. Marshall (1995). "Tn5384, a composite enterococcal mobile element conferring resistance to erythromycin and gentamicin whose ends are directly repeated copies of IS256." Antimicrob Agents Chemother **39**(5): 1147-53.

Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush et D. C. Hooper (2006). "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase." Nat Med **12**(1): 83-8.

Rosenberg, E. Y., D. Ma et H. Nikaido (2000). "AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump." J Bacteriol **182**(6): 1754-6.

Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens et L. Y. Li (1995). "Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements." Microbiol Rev **59**(4): 579-90.

Sandvang, D., F. M. Aarestrup et L. B. Jensen (1998). "Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104." FEMS Microbiol Lett **160**(1): 37-41.

Santé-Canada (2002). L'utilisation au Canada d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation: les conséquences pour la résistance et la santé humaine. S. Canada. [http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt\\_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/amr-ram\\_final\\_report-rapport\\_06-27-fra.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/amr-ram_final_report-rapport_06-27-fra.pdf) Accédé le 2008-11-05

Santé-Canada (2007). For Your Information: Facts About Tylosin. [http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/faq/tylosin\\_facts-renseignements\\_11-2002-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/faq/tylosin_facts-renseignements_11-2002-eng.php) Accédé le 2008-11-05

Schmitz, F. J., P. G. Higgins, S. Mayer, A. C. Fluit et A. Dalhoff (2002). "Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **21**(9): 647-59.

Shaw, J. H. et D. B. Clewell (1985). "Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*." J Bacteriol **164**(2): 782-96.

Simjee, S. et M. J. Gill (1997). "Gene transfer, gentamicin resistance and enterococci." J Hosp Infect **36**(4): 249-59.

Simjee, S., D. G. White, D. D. Wagner, J. Meng, S. Qaiyumi, S. Zhao et P. F. McDermott (2002). "Identification of *vat(E)* in *Enterococcus faecalis* isolates from retail poultry and its transferability to *Enterococcus faecium*." Antimicrob Agents Chemother **46**(12): 3823-8.

Simjee, S. e. a. (2006). *Enterococcus*. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. F. M. Aarestrup. Washington, ASM Press: 315-328.

Simonsen, G. S., H. Haaheim, K. H. Dahl, H. Kruse, A. Lovseth, O. Olsvik et A. Sundsfjord (1998). "Transmission of VanA-type vancomycin-resistant enterococci and *vanA* resistance elements between chicken and humans at avoparcin-exposed farms." Microb Drug Resist 4(4): 313-8.

Singh, K. V., K. Malathum et B. E. Murray (2001). "Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility." Antimicrob Agents Chemother 45(1): 263-6.

Singh, K. V., G. M. Weinstock et B. E. Murray (2002). "An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin." Antimicrob Agents Chemother 46(6): 1845-50.

Smilack, J. D. (1999). "Trimethoprim-sulfamethoxazole." Mayo Clin Proc 74(7): 730-4.

Soge, O. O., B. A. Adeniyi et M. C. Roberts (2006). "New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*." J Antimicrob Chemother 58(5): 1048-53.

Stokstad, E. L. R., T. H. Jukes et J. Pierce (1949). "The multiple nature of the animal protein factor." Journal of Biological Chemistry 180(2): 647-54.

Swann, M. M. (1969). Report of Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. L. HMSO.

Takeuchi, K., H. Tomita, S. Fujimoto, M. Kudo, H. Kuwano et Y. Ike (2005). "Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits." FEMS Microbiol Lett 243(2): 347-54.

Tannock, G. (1997). Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents and probiotics. Gastrointestinal microbiology. W. B. Mackie RI, Isaacson RE. New York, Chapman and Hall: 434–65.

Tannock, G. W., G. Cook (2002). Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and, and Antimicrobial Resistance M. S. G. e. al. Washington, ASM Press: 101-132.

Tenover, F. C. (2001). "Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview." Clin Infect Dis **33 Suppl 3**: S108-15.

Thal, L. A. et M. J. Zervos (1999). "Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins." J Antimicrob Chemother **43(2)**: 171-6.

Van Lunen, T. A. (2003). "Growth performance of pigs fed diets with and without tylosin phosphate supplementation and reared in a biosecure all-in all-out housing system." Can Vet J **44(7)**: 571-6.

Varel, V. H. et J. T. Yen (1997). "Microbial perspective on fiber utilization by swine." J Anim Sci **75(10)**: 2715-22.

Vazquez, G. J., I. E. Robledo, A. Arroyo, E. Nadal, R. Rodriguez, M. Bermudez et M. Colon (2003). "A comparison of the antimicrobial resistance patterns of gram-positive cocci isolated from community-private and university-affiliated hospitals from Puerto Rico." P R Health Sci J **22(2)**: 131-6.

Wade, J. J., N. Rolando, R. Williams et M. W. Casewell (1995). "Serious infections caused by multiply-resistant *Enterococcus faecium*." Microb Drug Resist **1(3)**: 241-3.

Wagner, B. A., B. E. Straw, P. J. Fedorka-Cray et D. A. Dargatz (2008). "Effect of antimicrobial dosage regimen on *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from feeder swine." Appl Environ Microbiol **74(6)**: 1731-9.

Weber, T. E., A. P. Schinckel, K. L. Houseknecht et B. T. Richert (2001). "Evaluation of conjugated linoleic acid and dietary antibiotics as growth promotants in weanling pigs." J Anim Sci **79**(10): 2542-9.

Wegener, H. C. (2002). Banning antimicrobial growth promoters in Europe: where does it make a difference? 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, American Society for Microbiology.

Weigel, L. M., R. M. Donlan, D. H. Shin, B. Jensen, N. C. Clark, L. K. McDougal, W. Zhu, K. A. Musser, J. Thompson, D. Kohlerschmidt, N. Dumas, R. J. Limberger et J. B. Patel (2007). "High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm." Antimicrob Agents Chemother **51**(1): 231-8.

Weisblum, B. (1995). "Erythromycin resistance by ribosome modification." Antimicrob Agents Chemother **39**(3): 577-85.

Werner, G., B. Hildebrandt, I. Klare et W. Witte (2000). "Linkage of determinants for streptogramin A, macrolide-lincosamide-streptogramin B, and chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium* and dissemination of this cluster among streptogramin-resistant enterococci." Int J Med Microbiol **290**(6): 543-8.

Wierup, M. (2001). "The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials." Microb Drug Resist **7**(2): 183-90.

Williamson, J. C., D. W. Craft, J. D. Butts et R. H. Raasch (2002). "In vitro assessment of urinary isolates of ampicillin-resistant enterococci." Ann Pharmacother **36**(2): 246-50.

Wisell, K. T., G. Kahlmeter et C. G. Giske (2008). "Trimethoprim and enterococci in urinary tract infections: new perspectives on an old issue." J Antimicrob Chemother **62**(1): 35-40.

## 6 Annexes

### Annexe 1 : Résultats de PCR

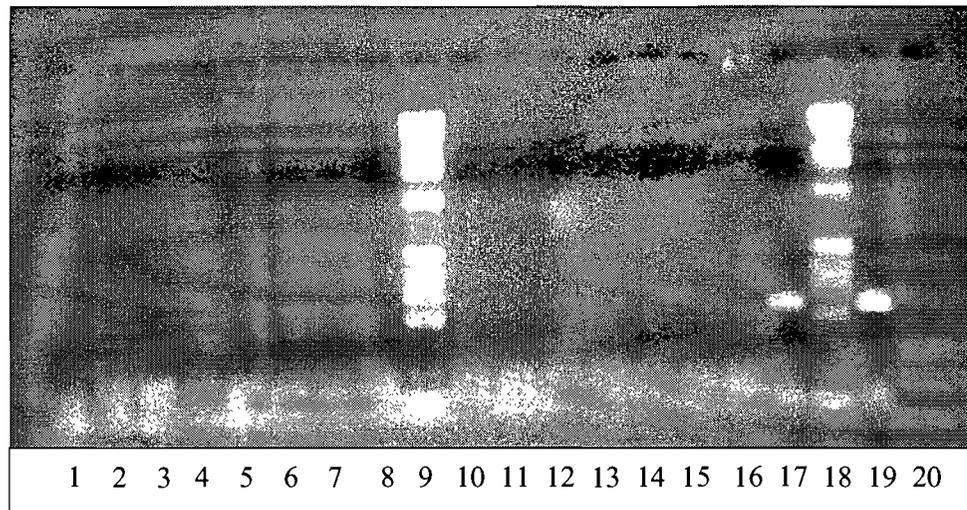
On a recherché le gène *vatD* chez des isolats d'*Enterococcus* du deuxième essai. Les résultats sont présentés dans le tableau III.

**Tableau III : Nombre d'isolats d'*Enterococcus* provenant du deuxième essai de l'étude dans lesquels on détecte le gène *vatD* par PCR.**

Temps / Groupe	Groupe Témoin	Groupe VG	Groupe Tylosine
Semaine 1	0 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)
Semaine 15	0 (n=15)	0 (n=15)	0 (n=15)

La figure 4 montre le résultat du PCR lors de la recherche du gène *vatD* chez les isolats d'*Enterococcus* provenant de porcs du groupe traité à la VG, lors de la semaine 1.

**Figure 4 : Résultats de PCR du gène *vatD* chez les *Enterococcus* du groupe VG à la semaine 1**



Puits 1 à 8 et 10 à 16 : isolats *Enterococcus*

Puits 9 et 18 : échelle de poids moléculaire «1kb ladder»

Puits 17 et 19 : Témoin positif *Enterococcus vatD+*

Puit 20 : Témoin négatif