

Traitements des pommiers à la streptomycine et résistances aux antibiotiques dans l'environnement

Fiona Walsh^{1,2}, Cosima Pelludat², Brion Duffy³, Daniel P Smith⁴,
Sarah M Owens⁴, Jürg E Frey² et Eduard Holliger²

¹National University of Ireland, Department of Biology, Maynooth, Co Kildare Ireland

²Agroscope, Institut des sciences en production végétale IPV, 8820 Wädenswil, Suisse

³ZHAW Life Sciences und Facility Management, Umweltgenomik und Systembiologie, Grüental, 8820 Wädenswil, Suisse

⁴Argonne National Laboratory, 60439 Illinois, Etats-Unis

Renseignements: Fiona Walsh, e-mail: fiona.walsh@nuim.ie



Verger à pommiers en pleine floraison.

Introduction

La streptomycine est un antibiotique isolé pour la première fois en 1943 à partir de la bactérie *Streptomyces griseus*. La découverte de son efficacité particulière contre le pathogène de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) a valu Selman Waksman le prix Nobel de médecine en 1952. La streptomycine tue les bactéries en inhibant la synthèse des protéines au niveau de leurs ribosomes. Les streptomycètes eux-mêmes, et d'autres bactéries exposées à la streptomycine, élaborent naturel-

lement des stratégies permettant de contourner ou de bloquer le mécanisme mortel de l'antibiotique: c'est ainsi que se développent des résistances à la streptomycine.

Il peut y avoir plusieurs causes à l'apparition d'une résistance à la streptomycine. Par exemple, des mutations génétiques peuvent modifier les ribosomes de telle manière que la streptomycine ne peut plus s'y lier pour inhiber la synthèse des protéines. Autre possibilité, des gènes de résistance (par exemple *strA* (*aph3*), *strB* (*aph6*) et *aadA* (*ant3*)) situés sur des éléments mobiles d'ADN, codent pour des enzymes inactivant la strepto-

mycine. Mobiles, de tels gènes de résistance peuvent se transmettre entre bactéries de la même espèce, mais aussi à des bactéries «apparentées». En médecine humaine, ces gènes mobiles de résistance sont les principaux responsables de la diffusion des résistances aux antibiotiques; ce sont eux aussi qui font craindre un transfert des gènes de résistance de l'agroécosystème vers des bactéries pathogènes pour l'être humain.

Dans le cadre de travaux préliminaires aux recherches décrites ci-après, Agroscope a démontré que les formulations de streptomycine appliquées dans les vergers de pommiers ne contenaient pas de gènes de résistance (Rezzonico *et al.* 2009).

Les résistances aux antibiotiques existent naturellement chez les bactéries. Cependant, on connaît mal la proportion de bactéries naturellement résistantes aux antibiotiques, et la mesure de l'influence humaine dans une possible évolution de cette proportion. Il a été établi que l'épandage de lisier provenant d'animaux d'engraissement traités aux antibiotiques favorise la dissémination de résistances aux antibiotiques dans l'environnement. De plus, il est apparu au cours des 35 dernières années que l'apparition de résistances à certains antibiotiques était corrélée à l'utilisation de ces derniers dans l'élevage. C'est pourquoi l'utilisation d'antibiotiques dans l'élevage fait l'objet de réglementations et de contrôles sévères dans l'Union européenne et en Suisse.

Le feu bactérien, une maladie causée par la bactérie *Erwinia amylovora*, s'attaque à d'importantes espèces végétales cultivées, par exemple le pommier, le poirier et le cognassier. En cas d'attaque massive, il faut arracher les arbres ou même les vergers entiers contaminés, afin d'empêcher que la maladie ne gagne les plantes voisines. La streptomycine est utilisée depuis 1955 déjà aux États-Unis pour lutter contre le feu bactérien. Avec une efficacité de 70 à 90 % contre les infections aux fleurs, c'est actuellement la meilleure substance active contre le feu bactérien. Pour éviter la dissémination de bactéries résistantes aux antibiotiques dans la chaîne alimentaire et les risques sanitaires qui en découleraient, l'utilisation de la streptomycine en arboriculture fruitière n'est pas autorisée dans l'Union européenne (sauf en Allemagne et en Autriche, où une autorisation exceptionnelle a été accordée pour la lutte contre le feu bactérien).

Après l'expansion catastrophique du feu bactérien en 2007, l'Office fédéral de l'agriculture a pour la première fois autorisé, l'année suivante, l'utilisation de streptomycine pour lutter contre *E. amylovora* dans les vergers en Suisse. L'utilisation était strictement limitée dans l'espace et dans le temps: au maximum trois applications à 130 grammes de substance active par hectare

Résumé ■ En 2008, l'Office fédéral de l'agriculture (OFAG) a autorisé l'utilisation contrôlée de la streptomycine pour combattre le feu bactérien. Cette autorisation a été accordée sous la condition que le développement de résistances aux antibiotiques soit étudié dans les vergers de pommiers traités. Agroscope à Wädenswil a conduit la première étude quantitative sur les gènes mobiles de résistance à la streptomycine et à la tétracycline (*strA*, *strB*, *aadA*, *tetB*, *tetM*, *tetW*) et sur la séquence d'insertion IS1133. Des fleurs, feuilles et échantillons de sol ont été pris dans trois vergers de pommiers qui ont été traités à la streptomycine en 2010, 2011 et 2012. L'abondance et la distribution des gènes de résistance ont été étudiées à différents moments et en fonction du traitement. Les gènes mobiles de résistance à la streptomycine et à la tétracycline ont déjà pu être détectés avant la première application de streptomycine dans presque tous les échantillons, ce qui documente la présence de ces gènes de résistance dans la nature. Des augmentations significatives de l'abondance de ces gènes de résistance n'ont été observées que dans des cas individuels, mais n'étaient pas constantes et n'ont pas été observées les années suivantes. Ce projet a aussi étudié l'effet de l'application de la streptomycine sur la communauté bactérienne du sol. Ces analyses n'ont également pas montré de différences significatives et constantes dans les échantillons du sol. Les résultats de cette étude montrent que l'application de la streptomycine dans les vergers de pommiers choisis n'a pas entraîné une augmentation des gènes de résistance à la streptomycine et à la tétracycline, et n'a également pas eu d'effets négatifs sur la composition de la population bactérienne du sol.

dans les vergers en fleurs. Pour évaluer les effets de ces applications de streptomycine sur l'environnement, Agroscope Wädenswil a procédé durant trois ans (2010–2012) à une étude détaillée sur mandat de la Commission fédérale d'experts pour la sécurité biologique (CFSB).

Matériel et méthodes

Dispositif de l'essai

L'étude a porté sur l'analyse des populations bactériennes d'échantillons de sol, de feuilles et de fleurs de plusieurs vergers (Wädenswil, Güttingen, Lindau ZH) ➤



Figure 1 | Exemples d'échantillons de fleurs, de feuilles et de fruits à la récolte (au total, trois sites et trois répétitions pour chaque traitement).

traités à la streptomycine. Comme l'antibiotique tétracycline est aussi autorisé aux États-Unis pour lutter contre le feu bactérien, la présente étude a porté également sur un éventuel effet croisé de l'application de streptomycine sur la résistance à la tétracycline. Tous les échantillons ont ainsi fait l'objet, en plus, d'une analyse PCR quantitative développée pour les gènes *tetB*, *tetM* et *tetW* de résistance à la tétracycline.

La streptomycine a été appliquée sur tous les vergers trois fois par saison de floraison, à la même dose par hectare et sur les mêmes arbres. Cette triple application correspond au nombre maximal autorisé en Suisse par saison de floraison (en 2008 et 2009 uniquement - le nombre maximal d'applications dans les vergers suisses ayant été réduit à deux pour les années suivantes). Cependant, l'essai en cours s'est poursuivi avec trois applications. Ainsi, les vergers étudiés étaient exposés à une plus grande

quantité de streptomycine que les vergers exploités commercialement. Dans l'essai, un nombre égal de pommiers a été traité à l'eau. Les procédés «streptomycine» et «eau» ont été répétés trois fois dans chaque verger, et des échantillons de fleurs/fruits, de feuilles et de sol ont été prélevés chaque fois dans chaque répétition (fig. 1).

Les traitements à l'eau et à la streptomycine ont été appliqués en trois répétitions sur des lignes alternées dans chacun des vergers de l'essai. Trois échantillons (fleurs/fruits, feuilles et sol) ont été prélevés chaque fois dans chaque ligne (fig. 2).

Le premier prélèvement d'échantillons a été fait à la date T1, un jour avant la première application de streptomycine. Les trois prélèvements suivants ont été faits un jour (T2) puis deux semaines (T3) après la troisième application de streptomycine et finalement à la récolte (T4) (fig. 2).

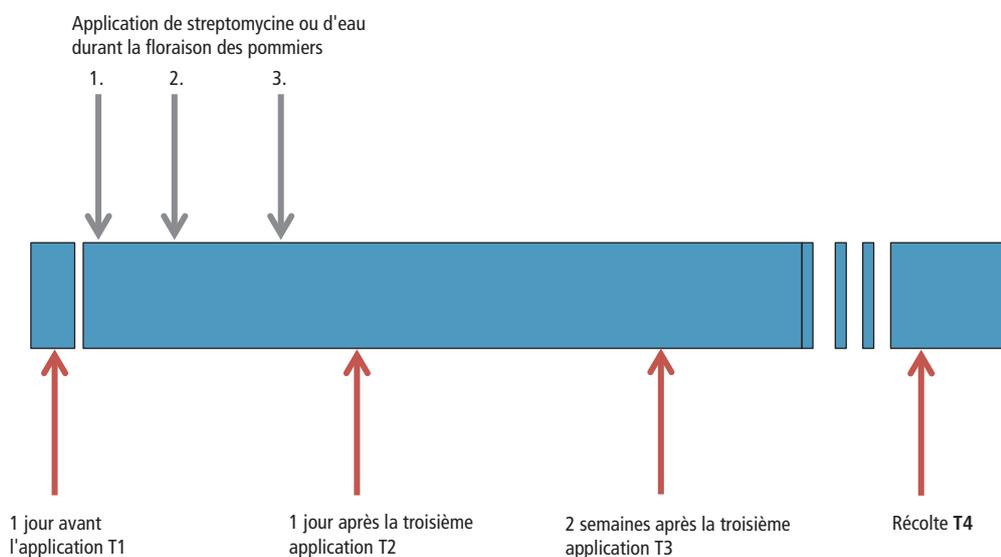


Figure 2 | Dispositif de l'essai avec les applications de streptomycine/d'eau et le calendrier des échantillonnages destinés aux analyses.

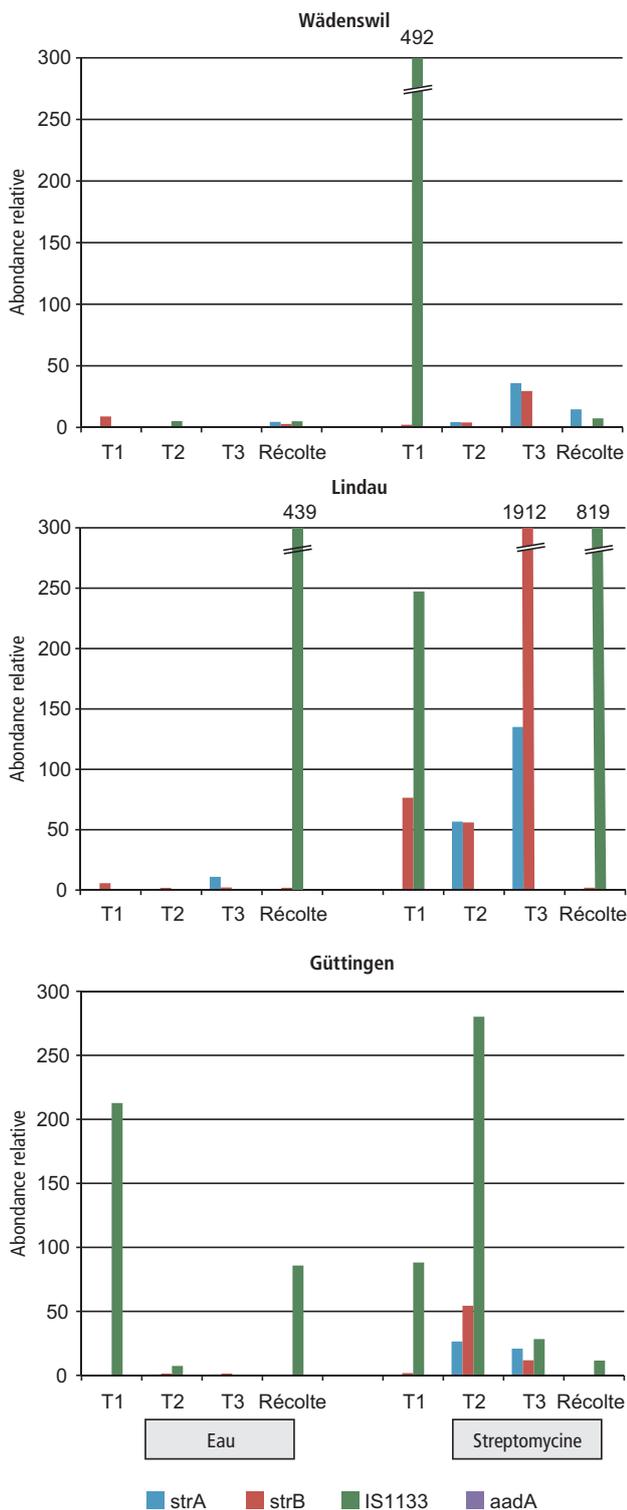


Figure 3 | Abondance relative des gènes de résistance à la streptomycine *strA*, *strB*, *aadA* et de l'élément d'insertion IS1133 (normalisé avec des produits PCR définis) des échantillons de fleurs des trois vergers de pommiers (Wädenswil, Lindau ZH et Güttingen). Trois applications de streptomycine, respectivement d'eau (témoin), ont été faites durant la saison de floraison. Les prélèvements d'échantillons ont été faits avant la première application (T1) puis à trois moments différents après la troisième application de streptomycine (T2, T3, récolte).

Mise en évidence et quantification des gènes de résistance

L'ADN total de chacun des échantillons a été isolé pour les procédures analytiques. Les gènes mobiles de résistance à la streptomycine *strA* (*aph3*), *strB* (*aph6*) et *aadA* (*ant3*) ainsi que la séquence d'insertion IS1133 associée à la présence de *strA* (*aph3*) et *strB* (*aph6*), ont été révélés au moyen d'une analyse PCR quantitative multiplexe (analyse de plusieurs gènes au cours d'une seule réaction) développée par Agroscope (Walsh *et al.* 2011). Le nombre total de bactéries présentes a été déterminé en standard interne sur la base du rRNA 16S présent dans toutes les bactéries. Ce procédé ainsi que les techniques utilisées prennent en considération le fait qu'une grande partie des bactéries présentes dans l'environnement ne peuvent pas être cultivées dans les conditions standards de laboratoire. Les procédés choisis permettent la détermination du nombre de bactéries dans chaque échantillon, à mettre ensuite en relation avec le nombre de résistances aux antibiotiques détectées. Les données récoltées ont fait l'objet d'une évaluation statistique au moyen du logiciel XLstat 2011 et du test ANOVA ($P < 0.05$).

Analyse de la population bactérienne du sol

L'éventualité de modifications dans la composition des populations bactériennes des neuf échantillons de sol provenant de parcelles de Güttingen, Lindau et Wädenswil (2008, 2011) traitées à la streptomycine ou à l'eau a été examinée. Pour ce faire, la région V4 du rRNA 16S des bactéries de ces échantillons a été séquencée afin de pouvoir définir et comparer les populations entre elles.

Résultats et discussion

À l'exception de *aadA*, les gènes de résistance à la streptomycine et à la tétracycline recherchés ont été détectés dans quasiment tous les échantillons, déjà avant le premier traitement à la streptomycine. Le gène *aadA* a été trouvé dans 15 échantillons. En 2010, une augmentation statistiquement significative de l'abondance des gènes *strA* et *strB* a été relevée dans les échantillons de fleurs de tous les vergers, un jour ainsi que deux semaines après les traitements (T2, T3) à la streptomycine. Cette augmentation n'a pas été observée en 2011. Aucune modification statistiquement significative de la présence de *aadA* n'a pu être constatée à aucun moment ni dans aucun des échantillons.

En comparant les échantillons (T1) des années 2010 et 2011, une différence statistiquement significative n'a pu être constatée quant à l'abondance des gènes de résistance. Cela suggère que trois applications de streptomycine par année n'exercent aucun effet à long terme sur l'abondance des gènes de résistance recherchés. ➤

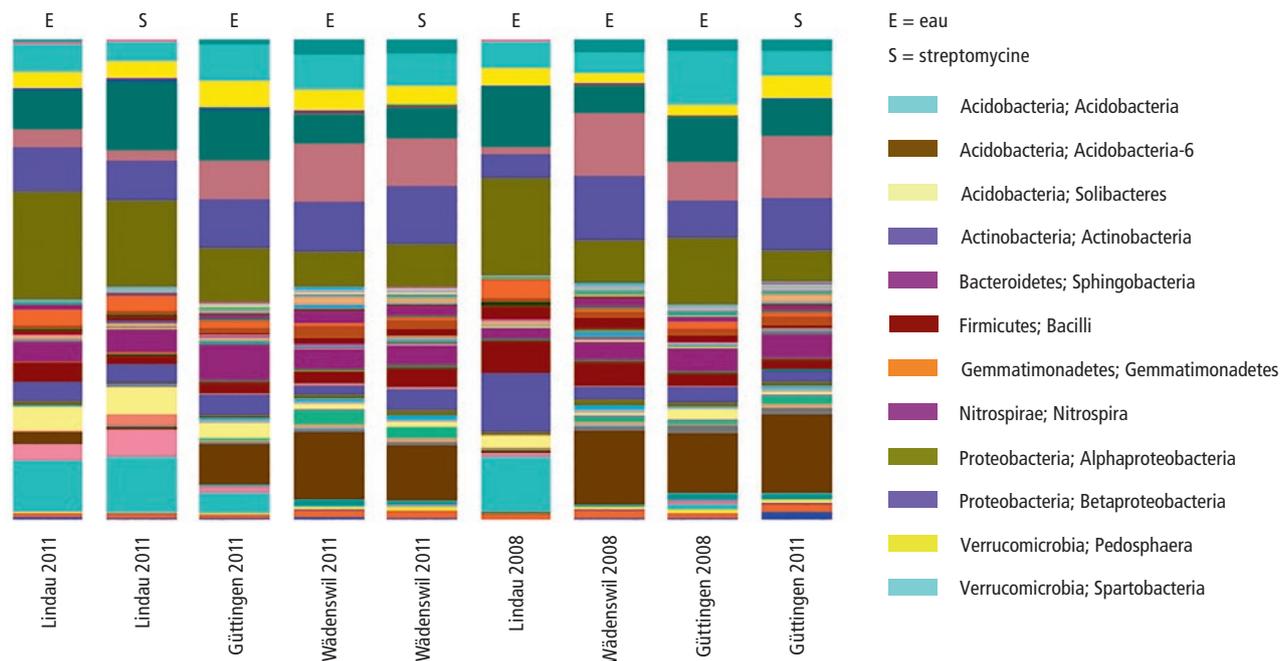


Figure 4 | Composition des communautés bactériennes des échantillons de sol analysés. La liste comprend les classes de bactéries présentes dans les échantillons de sol analysés (2008, 2011).

Concernant les gènes de résistance à la tétracycline, une augmentation statistiquement significative de l'abondance du gène *tetM* dans les échantillons de sol (T3) de Güttingen a été détectée en 2011. Toutefois cette augmentation n'était plus observable au moment de la récolte ni à aucune des périodes de prélèvement de l'année suivante. Une augmentation de l'abondance de *tetM* a également été constatée seulement dans les échantillons d'inflorescences (T2) de Güttingen, et une augmentation de l'abondance de *tetB* et de *tetW* seulement au temps de la récolte dans les fruits de Lindau.

Au cours des années de l'essai, on a constaté des augmentations statistiquement significatives, mais instables et non répétitives, du pool des résistances recherchées dans les échantillons de sols, de feuilles et de fleurs (fig. 3). Nous en déduisons que l'application de streptomycine à trois reprises par saison dans ces vergers de pommiers n'entraîne pas une augmentation durable des gènes de résistance à la streptomycine ou à la tétracycline (Duffy *et al.* 2014).

L'intérêt des chercheurs ne s'est pas concentré seulement sur l'influence d'un traitement à la streptomycine sur l'abondance des gènes de résistance, mais aussi sur la composition des communautés bactériennes. Les données relevées (fig. 4) montrent que l'application de streptomycine dans les vergers n'a pas entraîné une modification significative de la composition de la communauté bactérienne (Walsh *et al.* 2014). Si l'on consi-

dère que les bactéries de l'ordre des *Actinomycetales* présentes dans le sol (auquel appartient aussi *S. griseus*) sont connues comme productrices d'antibiotiques, ce résultat n'est pas étonnant. Les bactéries du sol ont disposé de millions d'années pour s'adapter aux antibiotiques et à leurs effets.

Les résultats de cette étude nous amènent à conclure que l'application de streptomycine dans les vergers de pommiers de cet essai n'a pas entraîné une augmentation durable de l'abondance des gènes de résistance à la streptomycine et à la tétracycline recherchés, et qu'elle n'a pas eu non plus d'incidence sur la composition de la population bactérienne. Les conditions très strictes imposées à l'utilisation de streptomycine limitée dans l'espace et dans le temps s'avèrent donc adéquates quant au risque de développement de résistances aux antibiotiques dans l'environnement. ■

Remerciements

Agroscope remercie l'Office fédéral de l'agriculture (OFAG) pour le financement de ce projet de recherche. Nous remercions aussi les chefs d'exploitation qui ont mis à notre disposition leurs vergers et procédé aux applications dans les parcelles expérimentales.

Riassunto

Effetto dello streptomycina nei meleti sulle resistenze agli antibiotici d'nell'ambiente

Nel 2008 l'Ufficio federale dell'agricoltura (UFAG) ha autorizzato l'uso regolamentato di streptomycina nella lotta contro il fuoco batterico. Una delle condizioni poste era il monitoraggio dello sviluppo della resistenza all'antibiotico usato negli appezzamenti trattati.

Inoltre Agroscope ha condotto i primi studi inerenti l'analisi quantitativa dei geni trasferibili di resistenza alla streptomycina e alla tetraciclina (*strA*, *strB*, *aadA*, *tetB*, *tetM*, *tetW*), così come quella della sequenza di inserzione IS1133 in appezzamenti trattati con streptomycina. Nel 2010, 2011 e 2012 sono stati raccolti campioni di fiori, foglie e terreno da tre diverse parcelle trattate con streptomycina. La presenza e la distribuzione delle suddette sequenze è stata analizzata per identificare gli effetti dovuti ai trattamenti. I geni mobili di resistenza agli antibiotici sono stati trovati in quasi tutti i campioni raccolti prima dei trattamenti con la streptomycina, cosa che indica la naturale distribuzione di questi geni nelle popolazioni del patogeno. Sporadicamente sono stati riscontrati aumenti significativi nella frequenza di questi geni, ma questi non sono stati osservati sistematicamente tra appezzamenti e non sono stati confermati con i campioni raccolti l'anno seguente. Infine è stata comparata la composizione batterica tra suoli prelevati da appezzamenti con e senza trattamento con streptomycina senza trovare differenze costanti e significative. Dai risultati ottenuti è stato possibile concludere che l'applicazione di streptomycina in meleti, seguendo le raccomandazioni attuali, non porta all'aumento dei geni mobili di resistenza agli antibiotici indagati in questo studio e non ha effetti negativi sulle popolazioni batteriche nel terreno.

Bibliographie

- Rezzonico F., Stockwell V. O. & Duffy B. 2009. Plant agricultural streptomycin formulations do not carry antibiotic resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* **53** (7), 3173–3177.
- Walsh F., Ingenfeld A., Zampiccoli M., Hilber-Bodmer M., Frey J. E. & Duffy B., 2011. Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *Journal of Microbiological Methods* **86** (2), 150–155.

Summary

Impact of streptomycin applications on antibiotic resistance in apple orchards

The Federal Office for Agriculture (FOAG) authorized the use of streptomycin to fight fire blight under controlled conditions in 2008 with the provision that the development of antibiotic resistance in the treated plots is monitored.

Agroscope in Wädenswil thus performed the first study to quantitatively analyze the influence of streptomycin use in agriculture on the abundance of the mobile streptomycin and tetracycline resistance genes (*strA*, *strB*, *aadA*, *tetB*, *tetM*, *tetW*) and the insertion sequence IS1133. Furthermore, the effect of the streptomycin treatment on the bacterial community structure was assessed. Flowers, leaves and soil were collected from three streptomycin-treated orchards in 2010, 2011 and 2012. The abundance and distribution of the resistance genes was analyzed at different time-points and included as a function of the treatment. The mobile antibiotic resistance genes were detected prior to streptomycin treatment in almost all samples, indicating the presence of these genes in nature. Statistically significant increases in the resistance gene abundance were occasional, inconsistent and not reproducible from one year to the next. Analysis of the bacterial community in soils from orchards with or without streptomycin treatment revealed no statistically significant or constant alterations.

We conclude that the application of streptomycin in these orchards led neither to an increase in streptomycin or tetracycline resistance gene abundance nor to a negative impact on the bacterial community.

Key words: streptomycin, antibiotics, apple orchard, development of resistance, bacterial community in soil.

- Duffy B., Holliger E. & Walsh, F. 2014. Streptomycin use in apple orchards did not increase abundance of mobile resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*. **350** (2), 180–9.4.
- Walsh F., Smith D. P., Owens S. M., Duffy B. & Frey J. E., 2014. Restricted streptomycin use in apple orchards did not adversely alter the soil bacteria communities. *Front. Microbiol.* **31** (4), 383.