



Effet *in vitro* de fractions de levure riche en mannane, sur la réduction de la croissance d'*Escherichia Coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu, résistantes aux antibiotiques chez le porcelet

Helen SMITH (1), Richard MURPHY (1), Raphael ARIAUX (2)

(1) Alltech Bioscience Centre, Sarney, Summerhill Road, Dunboyne, Co. Meath, Irlande

(2) Alltech, ZA La Papillonière, Rue Charles Amand, 14500, Vire, France

hsmith@alltech.com

***In vitro* impact of yeast mannan-rich fraction on growth reduction of antibiotic resistant extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from piglets**

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* represent one of the fastest-emerging resistance problems worldwide. β -lactamase enzymes are responsible for resistance to β -lactam antibiotics, frequently used in human and veterinary medicine. The occurrence of ESBLs in production animals has therefore significant implications for both animal and human health. The objective of this study was to assess the role of mannan rich fraction (MRF) from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* in mitigating antibiotic resistance in ESBL-producing *E. coli* isolated from pigs. The effect of MRF on ESBL-producing *E. coli* harbouring resistance to ampicillin, tetracycline and cefotaxime was assessed by monitoring microbial growth in the presence and absence of MRF and antibiotics. Overnight microbial growth of resistant ESBL-producing *E. coli* was measured using a microplate reader. Experiments were performed in triplicate and contained four replicate sample wells per test. A reference control with no antibiotic was included for comparison to cultures supplemented with MRF (0.5 %, w/v). Statistical analysis was performed using Minitab. One-way ANOVA and Fishers' multiple comparison was performed to test for significant differences among means, with a confidence level of 95 %. In the presence of MRF, the growth of multi-drug resistant ESBL-producing *E. coli* decreased significantly (54–92 %) ($p \leq 0.05$). In addition, when MRF supplementation was combined with antibiotic treatment, bacterial growth decreased an additional 20-30 % ($p \leq 0.05$). These findings suggest that application of MRF may facilitate new disease control methods by increasing the sensitivity of infectious resistant pathogens and could help reduce antibiotic use.

INTRODUCTION

Les *E. coli* sécrétant des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) représentent l'un des problèmes d'antibiorésistance les plus émergents au monde. Les enzymes β -lactamases compromettent l'efficacité de presque tous les antibiotiques de type β -lactamines et contribuent à la résistance des antibiotiques de type céphalosporines utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Les enzymes de type céfotaxime M sont en croissance rapide et représentent maintenant la famille de BLSE dominante et la plus diversifiée génétiquement. La présence de BLSE chez les animaux de production entraîne des répercussions importantes sur la santé animale et humaine, ce qui accroît dans le monde entier la pression pour limiter l'utilisation d'antibiotiques uniquement aux usages curatifs. Cela a contraint les éleveurs à développer depuis plus de dix ans, très souvent avec succès, des stratégies alternatives afin de réduire l'usage d'antibiotiques en élevage. Les fractions de

paroi cellulaire de levure de type *Saccharomyces cerevisiae* riches en mannane (MRF) sont connues pour réguler et soutenir l'environnement intestinal et son microbiote (Fouhse *et al*, 2019). L'objectif de cette recherche était d'évaluer le rôle des MRF sur la réduction de la résistance aux antibiotiques chez les *E. coli* BLSE. L'effet des MRF sur les *E. coli* BLSE multirésistantes (*E. coli* BLSE-MR) présentant une résistance à la fois à l'ampicilline, à la céfotaxime et à la tétracycline a été évalué en déterminant la croissance microbienne en présence et en l'absence de MRF et d'antibiotiques.

1. MATERIEL ET METHODES

Les *E. coli* BLSE-MR ont été isolées chez des porcelets provenant de trois fermes différentes en Irlande. La croissance microbienne d'*E. coli* BLSE a été évaluée *in vitro* en présence d'antibiotiques, avec ou sans supplémentation en MRF (prébiotique dérivé de paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*). Les antibiotiques examinés dans cette étude

comprenaient l'ampicilline, la céfotaxime et la tétracycline. Le taux de croissance bactérienne a été surveillé en présence de 0,5% MRF (poids par unité de volume) et d'antibiotiques (1mg/ml).

La croissance microbienne d'*E. coli* BLSE résistante a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques Tecan Infinite M200 Pro après 18 heures. La concentration bactérienne a été ajustée à 0,01 avec une densité optique (DO) à 595nm sur chaque microplaque. Trois essais répliqués par antibiotique ont été réalisés et chacun contenaient quatre répliquats par condition. Un témoin sans antibiotique a été inclus pour la comparaison avec des cultures supplémentées en MRF (0,5 %, poids par unité de volume). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel statistique Minitab (version 20.4). Une ANOVA unidirectionnelle avec la différence la moins significative (LSD) de Fisher a été réalisée pour tester les différences significatives entre les moyennes, avec un niveau de confiance de 95%.

2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Lorsque les MRF ont été ajoutés au milieu de croissance, il y avait significativement moins de croissance d'*E. coli* BLSE-MR ($p \leq 0,05$) (Figure 1 et 2).

Lorsque la supplémentation en MRF a été associée à un traitement antibiotique (ampicilline, céfotaxime ou tétracycline) un effet supérieur sur la diminution de croissance de bactéries résistantes a été observé ($p \leq 0,05$) comme le montre l'exemple avec l'ampicilline. (Figure 1)

La croissance d'*E. coli* BLSE-MR était inférieure de 54 à 63 % lorsque les MRF étaient ajoutées au milieu de croissance par rapport au témoin ($p \leq 0,05$), tandis que la supplémentation en MRF associée à un traitement antibiotique a résulté en une croissance bactérienne plus faible de 73 à 92 % ($p \leq 0,05$) (Figure 2).

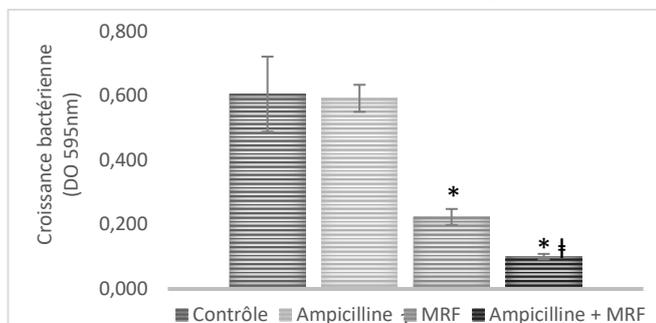


Figure 1 - Croissance d'*E. coli* BLSE-MR avec ou sans MRF et/ou ampicilline (1mg / ml).

Une croissance significativement plus faible par rapport au « contrôle » est marquée d'un astérisque [*] (Fisher-LSD, ANOVA, $p \leq 0,05$). Une croissance significativement plus faible par rapport à la MRF (Fraction Riche en Mannane), ou traitement antibiotique seul, est marquée par [†] (Fisher-LSD, ANOVA, $p \leq 0,05$). DO = Densité optique

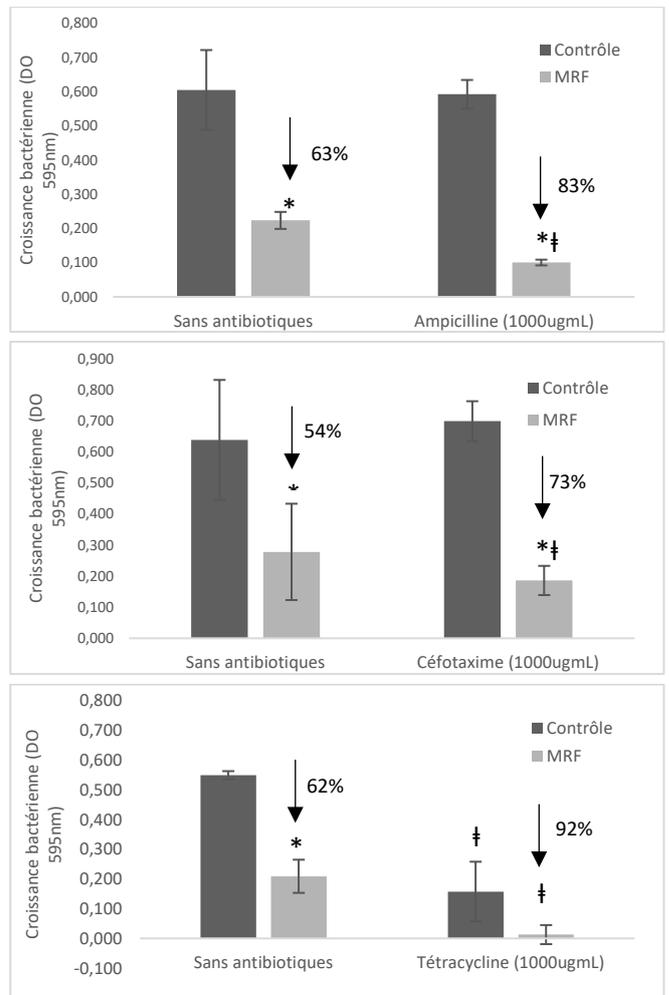


Figure 2 - Différence relative en pourcentage de croissance d'*E. coli* BLSE-MR avec supplémentation en MRF et en l'absence ou en présence de traitements antibiotiques (1mg / ml).

Une croissance significativement plus faible par rapport au « contrôle » pertinent est marquée d'un astérisque [*] (Fisher-LSD, ANOVA, $p \leq 0,05$). Une croissance significativement plus faible par rapport à la MRF, ou traitement antibiotique seul est marquée par [†] (Fisher-LSD, ANOVA, $p \leq 0,05$). DO = Densité optique

CONCLUSION

La MRF a entraîné une croissance significativement plus faible de bactéries *E. coli* BLSE-MR ($p \leq 0,05$). Ces résultats complètent les résultats obtenus lors d'études précédentes sur le mécanisme d'interaction des MRF avec les agents pathogènes (Smith *et al.*, 2020 ; Smith *et al.*, 2022) et suggèrent que l'application de MRF peut faciliter de nouvelles méthodes de contrôle des maladies en améliorant la sensibilité des agents pathogènes infectieux résistants aux antibiotiques. L'amélioration de la sensibilité des agents pathogènes résistants aux antibiotiques pourrait entraîner une réduction de l'utilisation des antibiotiques en élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- JM Fouhse, K Dawson, D Graugnard, M Dyck, BP Willing. 2019. Dietary supplementation of weaned piglets with a yeast-derived mannan-rich fraction modulates cecal microbial profiles, jejunal morphology and gene expression. *Animal*, 13, 1591-1598,
- Smith, H., Grant, S., Parker, J. et al. 2020. Yeast cell wall mannan rich fraction modulates bacterial cellular respiration potentiating antibiotic efficacy. *Sci. Rep.*, 10, 21880.
- Smith, H., Grant, S., Meleady, P., Henry, M., O'Gorman, D., Clynes, M., & Murphy, R. 2022. Yeast Mannan-Rich Fraction Modulates Endogenous Reactive Oxygen Species Generation and Antibiotic Sensitivity in Resistant *E. coli*. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 218