

INFLUENCE DE FAIBLES DOSES DE CHLORTÉTRACYCLINE SUR LA RÉSISTANCE À LA CHLORTÉTRACYCLINE DE *ESCHERICHIA COLI*, DANS LE TUBE DIGESTIF DE SOURIS AXÉNIQUES HÉBERGEANT DES FLORES COMPLEXES D'ENFANT, DE VEAU OU DE PORCELET

par **D. Corpet**

INRA, Laboratoire de Recherches sur les Additifs Alimentaires,
180 Chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse (France)

SUMMARY

A DYNAMIG STUDY OF DRUG RESISTANCE
IN POPULATIONS OF FECAL « *ESCHERICHIA COLI* »
FROM AXENIC MICE, FED CHLORTETRACYCLINE CONTINUOUSLY
AND ASSOCIATED WITH FLORA FROM INFANT, CALF AND PIGLET

In order to prove the effect of low doses of antibiotics on the level of drug resistance of the gastrointestinal flora, gnotoxenic mice, harboring various microflora from newborn calf, piglet or infant, were given continuously water containing 20 µg/ml chlortetracycline. Control mice, harboring the same flora, were maintained as well in isolators. Sensible and resistant fecal *Escherichia coli* were counted daily. Results showed that even before the introduction of the antibiotic in the water, drug-resistant *E. coli* were present in the feces at a level of about 10 % of the sensible *E. coli*. In the three experiments, chlortetracycline increased dramatically the level of resistance of fecal flora. The isolators preventing all possible bacterial contaminations, the observed increase was actually the result of the introduction of antibiotic in the water. However the sensible *E. coli* remained in high number in the feces, the resistant strains never becoming dominant. These results are discussed.

KEY-WORDS: Chlortetracycline, Drug resistance, Gut flora ; Feed additive, Gnotoxenic mice, Germfree mice, Human Fecal Flora associated mouse.

Abbréviations: DCA = désoxycholate agar. CMI = concentration minimale inhibitrice. CTC = chlortétracycline.

Manuscrit reçu le 25 août, 1980, accepté le 4 décembre 1980.

INTRODUCTION

Les antibiotiques sont utilisés à faible dose dans l'alimentation animale pour améliorer des performances zootechniques des animaux d'élevage. Mais l'un des reproches qui est fait à cette supplémentation - et qui a conduit la plupart des pays à en limiter l'emploi [16] - est qu'elle risque d'augmenter la résistance aux antibiotiques des bactéries intestinales des animaux [8]. L'existence même de ce risque dans le cas de faibles doses utilisées en alimentation animale, reste cependant à démontrer [6]. En effet, ni les expérimentations en étable [10] ni les enquêtes [13, 15] qui ont été réalisées ne permettent d'isoler l'action de

l'additif alimentaire de celle des traitements thérapeutiques, ou des diverses contaminations bactériennes possibles par l'éleveur, par l'aliment [7] ou par les animaux des autres lots [10].

Le seul moyen de démontrer une action de l'antibiotique utilisé comme additif, est de soustraire les animaux de leur environnement microbien, c'est-à-dire de les maintenir en isolateur [3]. Cela est difficile à réaliser avec les gros animaux d'élevage. C'est pourquoi nous avons pensé utiliser des souris axéniques maintenues en isolateur, chez qui nous avons implanté des flores d'autres animaux, ce type de modèle ayant déjà été utilisé et discuté [1, 4]. Parmi les antibiotiques qui ont été utilisés en alimentation animale, les tétracyclines sont ceux qui, dans les expérimentations sur le terrain, ont entraîné le plus régulièrement une augmentation du niveau de résistance de la microflore digestive [10]. C'est pourquoi l'action de la chlortétracycline (CTC) à la dose de 20 µg/ml d'eau de boisson a été testée chez des souris axéniques auxquelles on a implanté des flores complexes de nouveau-né, de veau et/ou de porcelet.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Animaux et sujets étudiés.

Le veau holoxénique est un veau mâle de 7 jours, de race Normande, nourri sous la mère, et provenant d'un petit élevage laitier de la région toulousaine. Ni le veau, ni la mère (depuis au moins une année) n'ont reçu d'antibiotique.

Le porcelet holoxénique, une femelle de 6 jours, de race Large White, est issu d'une portée de 10, et il a été élevé sous la mère, chez un "naisseur" de la région toulousaine. Ni le porcelet, ni la mère n'ont reçu d'antibiotique depuis au moins deux mois.

L'enfant holoxénique, une fille de 6 jours, a été nourrie au lait maternisé. Ni l'enfant, ni la mère n'ont reçu d'antibiotique depuis la naissance de l'enfant.

Les souris axéniques sont des femelles adultes de la lignée C3H, âgées de 8 semaines au début de l'expérience. Elles ont été maintenues dans des isolateurs plastiques munis d'un système de transfert rapide [5]. Elles ont reçu ad libitum un lait de remplacement dont la composition pour 100 g est la suivante : lait écrémé supplémenté en suif (à 38 % MG), 66 g ; poudre de lait écrémé, 25 g ; cérélose, 5,1 g ; mélange minéral, 3 g ; mélange vitaminique, 0,9 g. Ce lait se présente sous forme de granulés de 2,5 mm de diamètre, stérilisés sous vide par irradiation (4 MRads).

Les souris témoins ont reçu une eau de boisson stérile, acidifiée à pH 2,5 par HCl, de façon à éviter que des entérobactéries se développent dans le biberon. Les souris soumises aux expériences ont reçu de l'eau stérile contenant 20 µg de CTC (Sigma) par ml, et acidifiée à pH 2,5 pour éviter la dégradation de la CTC. Cette eau de boisson a été renouvelée chaque semaine, et on a vérifié, par un test microbiologique à l'aide de *Bacillus cereus*, que la concentration de CTC ne baisse pas de façon significative, dans le biberon des animaux. Les antibiotiques sont utilisés comme additifs alimentaires à des doses comprises entre 20 et 50 µg/g d'aliment. Les souris, qui boivent 5 ml et mangent 5 g par jour reçoivent donc l'antibiotique à des doses équivalentes à celles qui sont utilisées en alimentation animale.

2) Ensemencement des souris axéniques et prélèvements.

Pour ensemer les souris axéniques, on a utilisé des matières fécales fraîchement émises, diluées au 1/100^e et introduites en ampoules scellées dans les isolateurs, dans l'heure qui suit leur émission. Ces dilutions, obtenues chaque fois à partir de selles fraîches, ont été données à boire, pendant deux jours consécutifs, aux souris assoiffées depuis 24 heures.

Les pellets fécaux ont été prélevés au moment de leur émission, directement dans un tube stérile. Pour les souris hébergeant la flore de veau, les prélèvements et les numérations bactériennes ont été réalisés pour chaque animal individuellement. Dans les deux autres expériences les pellets des souris d'une même cage ont été rassemblés dans un même tube. Les prélèvements ont été pesés et dilués dans 100 fois leur poids de milieu de dilution II [11]. L'ensemencement des milieux de culture a été effectué dans l'heure qui a suivi le prélèvement.

3) Dénombrement et identification des bactéries.

Des dilutions décimales des prélèvements ont été effectuées dans le milieu liquide II [11]. Puis on a placé 1 ml de chaque dilution dans 8 ml de milieu desoxycholate agar (DCA, Difco) que l'on a coulé aussitôt en

boîte de Pétri. Les boîtes ont été alors séchées pendant 1,5 min à 37° C, puis incubées pendant 18 h à 37° C avant lecture. On a compté les colonies rouges (lactose+), et estimé que le nombre obtenu représente le nombre de *Escherichia coli* par g de selles fraîches. En effet, les colonies lactose+ dominantes ont été identifiées dans tous les cas testés (60 souches en tout) comme appartenant à l'espèce *E. coli*.

Les bactéries résistantes à la CTC ont été dénombrées de la même manière, le milieu étant additionné de 20 µg/ml de CTC. On a vérifié en milieu liquide, que la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les souches sensibles est inférieure à 2 µg/ml de CTC et que celle pour les souches résistantes est supérieure ou égale à 40 µg/ml. On a aussi vérifié que les bactéries d'une souche pure résistante sont dénombrées de la même façon sur milieu de Mueller Hinton, sur DCA et sur DCA additionné de CTC. Les techniques de numération et d'identification des bactéries dominantes de la microflore fécale, autres que *E. coli*, ont été décrites par Ducluzeau [4].

4) Conduite des expériences.

Trois expériences ont été effectuées par ensemencement de souris axéniques avec une flore de veau, une flore de porcelet ou une flore de nouveau-né. On a inoculé chacune des flores complexes à huit souris, puis on a séparé les animaux en deux lots de 4, et chaque lot a été mis dans un isolateur. Un lot a reçu de façon continue la CTC dans son eau de boisson (20µg de CTC par ml) ; l'autre lot a servi de témoin. Les *E. coli* sensibles et résistantes ont été dénombrées quotidiennement dans les selles des souris. Trois dosages d'antibiotiques ont été réalisés, au cours de chacune des 3 expériences, à partir des selles des animaux qui recevaient la CTC, selon la technique décrite par Van der Waaij [18].

RÉSULTATS

1) Action de 1a CTC sur la microflore fécale de souris hébergeant une flore de veau.

Dans les selles du veau holoxénique donneur de la flore complexe, le nombre de *E. coli* sensibles est de 5×10^8 , et le nombre de *E. coli* résistants à la CTC de 5×10^7 . La flore dominante des selles de ce veau est constituée de *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Clostridium sp.* ainsi que de *Streptococcus sp.* Tous ces genres bactériens sont à un niveau supérieur à 10^9 bactéries cultivables/g de selles.

Les résultats de l'expérimentation menée sur les souris hébergeant la flore de veau sont reportés sur la figure 1. On constate, chez les souris témoins, une baisse du nombre de *E. coli* sensibles à la CTC, ce nombre passant en 20 jours de 5×10^8 à 5×10^6 bactéries/g de selles. Pendant le même temps, chez ces mêmes souris, le nombre de *E. coli* résistants à la CTC a diminué de 3×10^7 à 3×10^3 /g. Trente jours plus tard les *E. coli* résistants à la CTC ne sont plus dénombrables (nombre inférieur à 10^2 /g) dans les selles de ces souris.

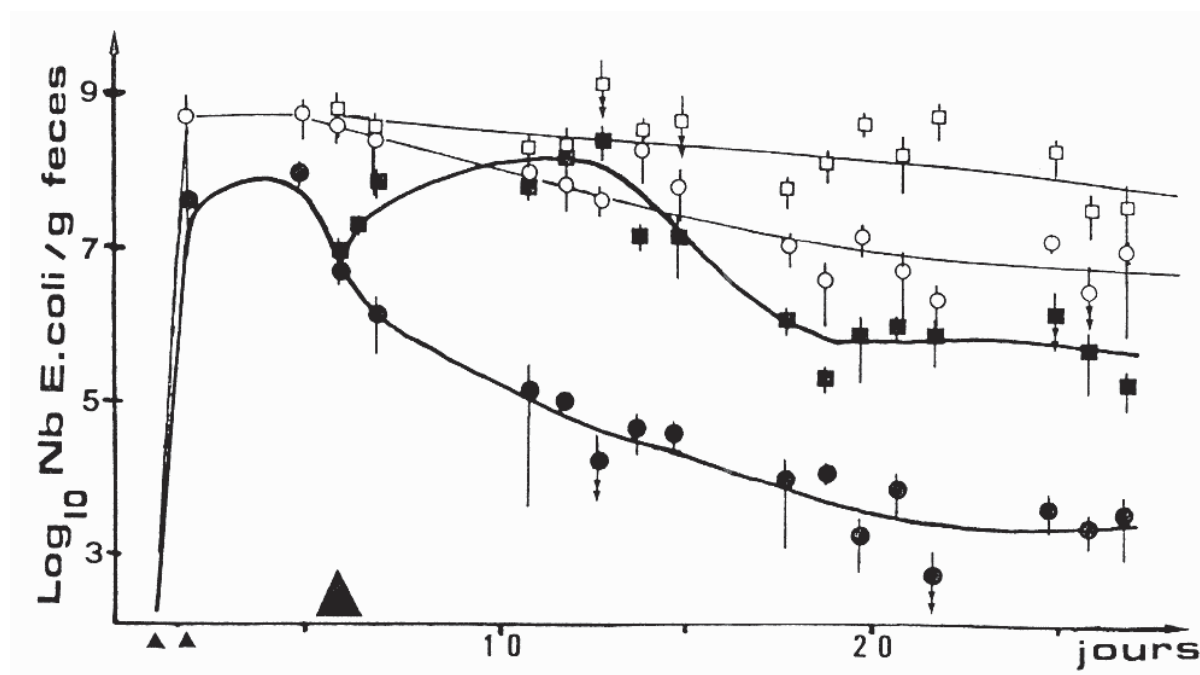


Fig. 1. - Influence de l'administration continue de 20 µg de CTC/ml d'eau de boisson, sur le nombre de *E. coli* des selles de souris axéniques ensemencées avec une flore de veau.

E. coli sensibles (O) et résistants (●) des selles des souris témoins ; *E. coli* sensibles (□) et résistants (■) des selles des souris recevant la CTC.

Chaque point représente la moyenne de quatre mesures. Les barres verticales représentent les écarts-types, leur dissymétrie étant due à la représentation logarithmique ; les flèches dirigées vers le bas représentent l'écart-type supérieur à la moyenne ; ▲ = inoculation de la flore complexe aux souris axéniques ; ▲ = début de l'administration de CTC aux souris.

Chez les souris qui ont reçu la CTC, le nombre de *E. coli* sensibles a moins diminué que chez les témoins. Le nombre de *E. coli* résistants a augmenté dans les quelques heures qui ont suivi l'addition de CTC à l'eau de boisson. Sept jours plus tard, le nombre de *E. coli* résistants représente 60 % du nombre total de *E. coli*. Le nombre de *E. coli* résistants a diminué progressivement pour ne plus représenter que 0,5 % du nombre total de *E. coli* 20 jours après le commencement de l'expérience, malgré l'administration continue de CTC dans l'eau de boisson des souris.

Les espèces dominantes de la flore fécale des souris, 15 jours après l'implantation de la flore de veau, sont les mêmes que chez le veau, chez les souris témoins et chez celles qui ont reçu de la CTC.

2) Action de la CTC sur la microflore fécale de souris hébergeant une flore de porcelet.

Il y a dans les selles du porcelet donneur 7×10^7 *E. coli* sensibles et 1×10^6 *E. coli* résistants à la CTC. La flore dominante de ce porcelet est constituée de plusieurs *Streptococcus sp.* exclusivement. Dans les selles des souris hébergeant la flore du porcelet, le nombre de *E. coli* sensibles est resté égal à 3×10^9 /g chez les témoins, comme chez les souris recevant la CTC. Par contre le nombre de *E. coli* résistants qui est de 3×10^7 chez les témoins, est environ de 5×10^8 chez les souris recevant la CTC (fig. 2). Les streptocoques sont restés dominants, et à des niveaux équivalents chez les deux lots de souris.

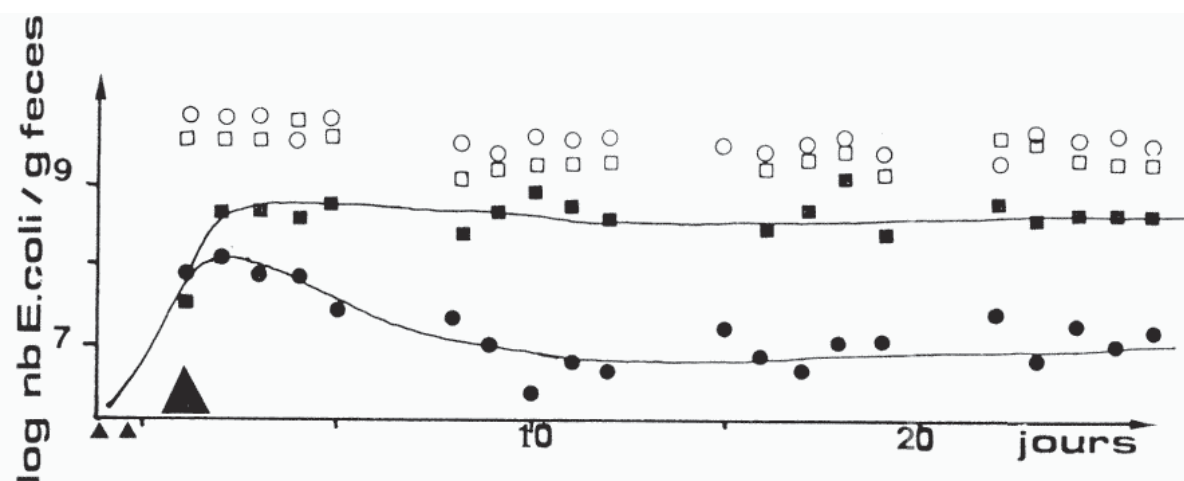


Fig. 2. - Influence de l'administration de CTC sur le nombre de *E. coli* dans les selles de souris axéniques hébergeant une flore de porcelet.

Symboles : cf. ceux de la figure 1.

3) Action de la CTC sur la microflore fécale de souris hébergeant une flore de nourrisson.

Les selles du nourrisson hébergent 3×10^6 *E. coli* sensibles et 1×10^4 *E. coli* résistants. Les espèces dominantes des selles du nourrisson sont *Bacteroides sp.* et *Clostridium sp.* à un niveau compris entre 2 et 5×10^9 . Les entérobactéries sont surtout représentées par *Proteus sp.* présent à 3×10^8 . On trouve en nombre plus faible (entre 3×10^8 , et 1×10^9) *Bifidobacterium sp.* et *Streptococcus sp.*

Le nombre de *E. coli* sensibles, compris entre 10^6 et 10^7 , n'est pas différent chez les souris témoins et chez celles recevant la CTC (fig. 3). Le nombre de *E. coli* résistants dans les selles des souris témoins représente 0,1 à 1 % du nombre de *E. coli* sensibles alors que, chez les souris recevant la CTC, le nombre de *E. coli* résistants est 30 à 70 % de celui de *E. coli* sensibles (fig. 3). Ces pourcentages ont été vérifiés par repiquage d'une centaine de souches prélevées sur les boîtes de Pétri sans CTC, et ayant servi à dénombrer *E. coli*, sur les boîtes de milieu contenant $20 \mu\text{g/g}$ de CTC. Cela a été réalisé pendant quatre jours consécutifs, et a confirmé les pourcentages de *E. coli* résistants obtenus par les dénombrements sélectifs. Nous avons obtenu, en moyenne sur quatre jours, 36 % de résistants par les dénombrements sélectifs directs, et 29 % par les repiquages sur milieu additionné de CTC.

Les espèces dominantes dans les selles des souris ensemencées avec la flore fécale du nourrisson sont les mêmes que chez cc dernier, avec une augmentation du nombre de *Bifidobacterium sp.* et de *Streptococcus sp.* et une diminution du nombre de *Clostridium sp.* qui sont devenus sous-dominants, ainsi que les *Proteus sp.* dont le nombre s'est stabilisé aux environs de 3×10^7 . Aucune différence notable n'a pu être mise en évidence entre les flores fécales des souris témoins et de celles qui recevaient la CTC.

4) Concentration en antibiotique des selles des animaux.

Dans les 3 expériences, chez les souris qui ont reçu en continu $20 \mu\text{g}$ de CTC par ml d'eau de boisson, on a trouvé une concentration de $25 \pm 9 \mu\text{g/g}$ de CTC dans les selles.

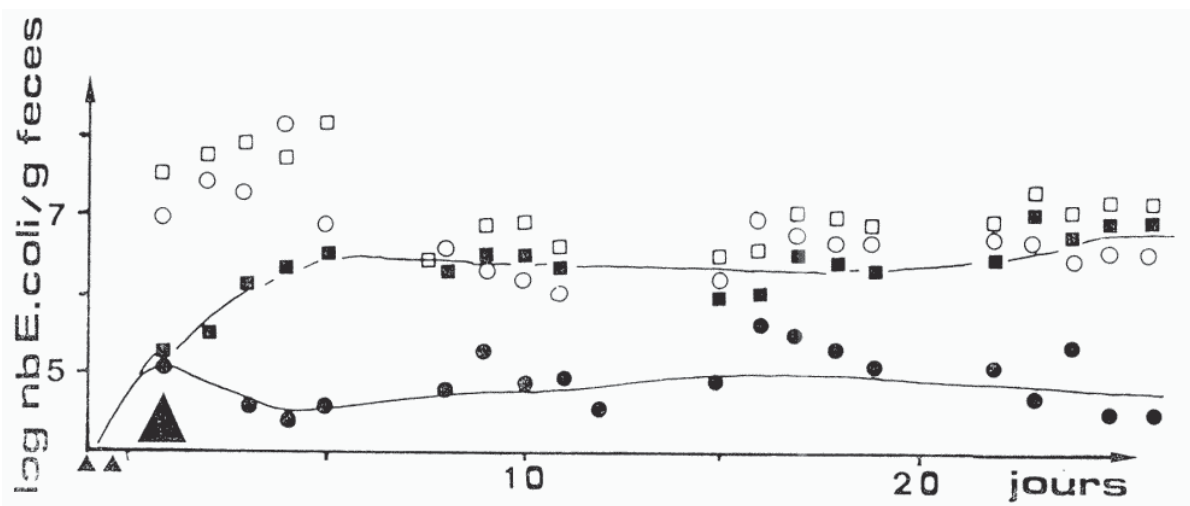


Fig. 3. - Influence de l'administration de CTC sur le nombre de *E. coli* dans les selles de souris axéniques hébergeant une flore de nouveau-né.

Symboles : cf. ceux de la figure 1.

DISCUSSION

Malgré l'absence de pression de sélection chez les 3 groupes de souris holoxéniques qui n'avaient jamais reçu d'antibiotiques, on retrouve dans leurs selles un nombre élevé de *E. coli* résistants à la CTC, mais toujours inférieur d'une ou deux puissances de 10 au nombre de *E. coli* sensibles. Cela vient corroborer les résultats d'enquêtes établies chez l'homme et l'animal d'élevage [9, 14].

L'apport de 20 µg de CTC /ml d'eau de boisson, a entraîné une augmentation de 1,5 à 3 puissances de 10, du nombre de *E. coli* résistants, dans les selles des souris. Malgré la diversité des flores hébergées par les souris, cet effet est apparu extrêmement net dans les 3 expériences. Cette augmentation du nombre de résistants ne peut être que la conséquence de l'action de la CTC dans le tube digestif des souris ; en effet celles-ci sont isolées de tout contact avec l'environnement bactérien, et les *E. coli* ne peuvent se développer dans l'eau de boisson en raison de son pH bas. Par rapport aux travaux réalisés par d'autres auteurs sur des animaux d'élevage, l'effet spécifique de la CTC est bien mis en évidence pour deux raisons : d'une part la variabilité entre souris d'un même lot (fig. 1) et pour un même lot d'un jour à l'autre (fig. 1, 2 et 3) est plus faible que dans les expériences réalisées sur les animaux d'élevage ; d'autre part, il n'y a pas contamination en cours d'expérience, des animaux témoins par des bactéries résistantes provenant des animaux antibio-supplémentés, comme c'est le cas dans les travaux réalisés sur animaux non isolés [10]. L'action de doses alimentaires d'antibiotiques sur l'augmentation du nombre de *E. coli* résistants se trouve ainsi rigoureusement démontrée dans trois systèmes écologiques différents, isolés de toute contamination bactérienne. Ce type de modèle pourrait être utilisé pour tester rapidement et de façon fiable l'action de nouvelles substances proposées comme additifs alimentaires, sur le niveau de résistance aux antibiotiques de la microflore digestive.

Dans les trois expériences réalisées, et malgré l'augmentation du nombre de *E. coli* résistants sous l'action de la CTC, le nombre de *E. coli* sensibles est toujours resté supérieur à celui des résistants. Cela semble être en désaccord avec les résultats d'autres auteurs qui observent une disparition complète des bactéries sensibles [3], mais reflète ce qui se passe dans les élevages de veaux et de porcelets où l'on trouve le plus souvent les *E. coli* sensibles en dominance, malgré l'utilisation d'antibiotiques dans l'alimentation [10, 14, 15]. Cette constatation amène deux questions.

1) On peut se demander comment les *E. coli* sensibles, dont la CMI est comprise entre 0,5 et 2 µg/ml se sont maintenus dans le tube digestif des souris alors que la CTC est excrétée en majeure partie dans les selles, où on la retrouve à une concentration de 25 µg/g.

2) Il serait par ailleurs intéressant de savoir par quel mécanisme la CTC entraîne une augmentation du nombre de *E. coli* résistants. Certains auteurs expliquent cette augmentation par la disparition des souches de *E. coli* sensibles sous l'influence de l'antibiotique, et le remplacement par des bactéries résistantes [10, 15]. Ils nomment sélection ce remplacement des bactéries sensibles par les résistantes. Mais ce modèle simple, qui permet d'expliquer les phénomènes observés *in vitro*, ne peut être retenu dans le cas de nos expériences, car nous n'observons pas d'élimination des *E. coli* sensibles sous l'influence de l'antibiotique.

Nous proposons une hypothèse qui pourrait expliquer cette augmentation du nombre de *E. coli* résistants, ainsi que sa baisse secondaire dans le cas de la flore de veau (fig. 1). Dans un premier temps la CTC modifierait l'équilibre écologique de la microflore, en éliminant ou en défavorisant certaines espèces bactériennes dominantes, autres que *E. coli*. Ce type d'action, qui n'a pu être mis en évidence dans nos expériences, sans doute en raison de l'imprécision de nos techniques, a été observé par d'autres auteurs [2, 12]. Ces modifications de la flore dominante entraîneraient une diminution des effets de barrière exercés par cette flore contre les *E. coli* résistants, dont le nombre augmenterait (en supposant que les effets barrière qui s'exercent sur les *E. coli* sensibles et résistants ne sont pas les mêmes). Cette destruction des barrières écologiques par les antibiotiques a déjà été mise en évidence, avec des doses thérapeutiques, par Tancrede et Raibaud [17]. Dans un deuxième temps, la flore dominante se rétablirait, peut-être en devenant résistante à l'antibiotique, et l'effet de barrière contre les *E. coli* résistants serait restauré.

Nous sommes en voie de réaliser des modèles mono- et dixéniques (souris axéniques ensemencées avec une souche de *E. coli* sensible, ou une souche sensible et une souche résistante) pour éclaircir le mécanisme d'action de l'antibiotique sur le nombre de *E. coli* résistants, en séparant l'action directe de la CTC de celle des effets barrière de la microflore. Les modèles monoxéniques nous permettent par ailleurs de chercher à comprendre pourquoi l'antibiotique n'élimine pas les *E. coli* sensibles du tube digestif.

Résumé

Afin de démontrer l'action de faibles doses d'antibiotiques sur le niveau de résistance des populations de *Escherichia coli* du tube digestif, des microflores fécales de veau, de porcelet et/ou de nouveau-né ont été inoculées à des souris axéniques. Celles-ci ont ensuite reçu de façon continue 20 µg de chlortétracycline/ml d'eau de boisson.

Chez les animaux holoxéniques de départ, qui n'ont jamais reçu d'antibiotique, le nombre de *E. coli* résistants à la chlortétracycline est élevé, et égal environ au 1/10e du nombre de bactéries sensibles. Sous l'influence de l'antibiotique le nombre de *E. coli* résistants a augmenté de 1,5 à 3 puissances de 10 chez nos trois modèles qui, maintenus en isolateur, ne pouvaient pas être contaminés par les bactéries extérieures. Malgré l'administration continue d'antibiotique le nombre de *E. coli* sensibles n'a pas été modifié, et il est resté toujours supérieur au nombre de résistants.

MOTS-CLÉS : Chlortétracycline, Antibiorésistance, Microflore digestive ; Additif alimentaire, Souris gnotoxénique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Corpet, D. & Nicolas, J.-L., Antagonistic effect of intestinal bacteria from the microflora of holoxenic (conventional) piglets, against *Clostridium perfringens* in the digestive tract of gnotoxenic mice and gnotoxenic piglets. Clin. exp. Gnotobiotics (T. M. Fliedner et al.), in Zbl. Bakt., 1979, (suppl. 7), 169-174.
- [2] Decuypère, J., Henderick, H. & Vervaeke, L, Influence of nutritional dose of virginiamycin and spiramycin on the quantitative and topographical composition of the gastrointestinal flora of artificially reared piglets. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 1973, 223 A, 348-355.
- [3] Ducluzeau, R., Bellier, M. & Raibaud, P., Effet de l'ingestion de doses variées d'antibiotiques sur la microflore de souris gnotoxéniques. Ann. Inst. Pasteur, 1971, 121, 161-179.
- [4] Ducluzeau, R., Rapine, P., Courvalin, C. & Raibaud, P., Transfert de la flore microbienne fécale de porcelets et de porcs adultes holoxéniques à des souris adultes et des porcelets axéniques : effet de l'animal-hôte et du régime alimentaire sur le faciès microbien du tube digestif des divers animaux. Ann. microbiol. (Inst. Pasteur), 1978, 129 B, 597-612.
- [5] Ducluzeau, R., Moreau, C., Corpet, D., Tancrede, C., Meyer, D. & Saint-Martin, M., Improvement of techniques leading to time sharing in rearing gnotoxenic animals. Clin. Exp. Gnotobiotics (T. M. Fliedner et al.) in Zbl. Bakt., 1979, (suppl.7) 83-85.
- [6] Finland, M., Relationship of antibiotics in animal feeds and salmonellosis in animals and man. J. Anim. Sci., 1975, 40, 1222-1236.
- [7] Guillot, J. F., Chaslus-Dancla, E. & Lafont, J. P., Spontaneous implantation of antibiotic-resistant enterobacteriaceae in the digestive tract of chickens in the absence of selective, pressure. Antimicrob. Agents Chemother., 1977, 12, 697-702.
- [8] Kiser, J. S., A perspective on the use of antibiotics in animal feeds. J. Anim. Sci., 1976, 42, 1058-1072.
- [9] Lemozy, J., La résistance des bactéries aux antibiotiques en population urbaine. Sci. Tech. Anim. Lab., 1976, 1, 170-171.
- [10] Linton, A. H., Howe, K. & Osborne, A. D., The effects of feeding tetracycline, nitrovin and quindoxin on the drug resistance of *Coli-aerogenes* bacteria from calves and pigs. J. appl. Bact., 1975, 38, 255-275.
- [11] Raibaud, P., Dickinson, A. B., Saquet, E., Charlier, H. & Mocquot, G., La microflore du tube digestif du rat. - 1. Techniques d'études et milieux de culture proposés. Ann. Inst. Pasteur, 1966, 110, 568-590.
- [12] Raibaud, P., Dickinson, A. B., Modifications observées dans la microflore du tube digestif des animaux après antibio-supplémentation à taux faibles. Cah. Méd. Vét., 1969, 38, 175-180.
- [13] Renault, L. & Roux, J., Résistances aux agents antibactériens des *Escherichia coli* de la flore intestinale de volailles recevant ou non des antibiotiques à dose nutritive dans leur alimentation. Élevages familiaux et industriels. Rec. Méd. Vet., 1972, 148, 1035-1043.
- [14] Siegel, D., Huber, W. G. & Enloe, F., Continuous non-therapeutic use of antibacterial drugs in feed and drug resistance of the Gram-negative enteric flora of food producing animals. Antimicrob. Agents Chemother., 1974, 6, 697-701.
- [15] Smith, H. W. & Crabb, W. E., The effect of the continuous administration of diets containing low levels of tetracyclines on the incidence of drug-resistant *Bacterium coli* in the faeces of pigs and chickens: the sensibility of the *Bacterium coli* to other chemotherapeutic agents. Vet. Rec., 1957, 69, 24-30.
- [16] Swann, M. A., Joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Her Majesty's Stationery Office, London, 1969.
- [17] Tancrede, G., Azizi, P., Raibaud, P. & Ducluzeau, R., Conséquences de la destruction des barrières écologiques de la flore du tube digestif par les antibiotiques. Perturbations des relations entre l'hôte et les bactéries potentiellement pathogènes. Méd. Mal. infect., 1977, 7, 145-149.
- [18] Van Der Waaij, D. & Sturm, C. A., Antibiotic decontamination of the digestive tract of mice. Technical procedure. Lab. Anim. Care, 1968, 18, 1-10.
- [19] Yacowitz, H. & Bird, O. D., Antibiotic levels in the digestive tract of the chick. Poultry Sci., 1953, 32, 966.