

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ANNÉE 2006



N°349

## THÈSE

PRÉSENTÉE PAR

**ALFRED DIEUDONNÉ KINANA**

POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE DE CHIMIE ET BIOCHIMIE DES PRODUITS NATURELS

**MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX QUINOLONES ET  
DIVERSITÉ DES SOUCHES DE *CAMPYLOBACTER*  
ISOLÉES AU SENEGAL**

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

Le 10 juillet 2006

## MEMBRES DU JURY

<b>Président</b>	<b>: Mr Abdoulaye SAMB</b>	<b>Professeur (FST)</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>: Mr Cheikh Saad-Bouh BOYE</b>	<b>Professeur (FMPOS)</b>
<b>Membres</b>	<b>: Mme Rianatou Bada ALAMBEDJI</b>	<b>Maître de conférences (EISMV)</b>
	<b>Mr Ngor FAYE</b>	<b>Maître de conférences (FST)</b>
	<b>Mr Jean-David PERRIER</b>	<b>Biologiste (IPD)</b>
	<b>Mr Mbacké SEMBENE</b>	<b>Maître assistant (FST)</b>

**Titre : Mécanismes de résistance aux quinolones et diversité des souches de *Campylobacter* isolées au Sénégal.**

Prénoms & Nom du candidat : **Alfred Dieudonné KINANA**

Nature de la thèse : **Doctorat de troisième cycle de chimie et biochimie des produits naturels**

Soutenue le : 10 Juillet 2006

**JURY**

<b>Président</b>	: <b>Mr Abdoulaye SAMB</b>	<b>Professeur (FST)</b>
<b>Directeur de thèse</b>	: <b>Mr Cheikh Saad-Bouh BOYE</b>	<b>Professeur (FMPOS)</b>
<b>Membres</b>	: <b>Mme Rianatou Bada ALAMBEDJI</b>	<b>Maître de conférence (EISMV)</b>
	<b>Mr Ngor FAYE</b>	<b>Maître de conférences (FST)</b>
	<b>Mr Jean-David PERRIER</b>	<b>Biologiste (IPD)</b>
	<b>Mr Mbacké SEMBENE</b>	<b>Maître assistant (FST)</b>

**Résumé**

Au Sénégal, il y a très peu de données sur l'épidémiologie des *Campylobacter* spp. Les seules données disponibles concernent la filière aviaire, et indiquent que l'incidence des *Campylobacter* résistants aux fluoroquinolones atteint 40 % des souches isolées. Chez les *Campylobacter* spp., la résistance aux quinolones est liée à la présence de mutations dans une région de la protéine GyrA appelée « Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) ». La mutation thréonine→isoleucine à la position 86 du QRDR est le mécanisme de résistance prédominant aux quinolones. Mais cette mutation est associée à des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très variées des quinolones, suggérant que d'autres facteurs agiraient sur la CMI finale conférée par cette mutation. D'un autre côté, des souches résistantes aux quinolones mais sans mutations dans le QRDR ont été déjà décrites.

Afin d'expliquer la variabilité des CMI observées pour une même mutation mais aussi les mécanismes de résistance des souches sans mutation, nous avons, dans un premier temps, recherché la présence d'autres mutations en séquençant les gènes codant pour les topoisomérase II et IV. Dans un deuxième temps, nous avons recherché la présence d'intégrons de classe 1 par la PCR, de pompes à efflux et enfin analysé la structure des lipopolysaccharides (LPS) des membranes bactériennes par électrophorèse verticale en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Par la suite, nous avons étudié l'émergence de la résistance et la diversité génétique des *Campylobacter* par la méthode appelée « *Multilocus Sequence Typing* (MLST) ». Les CMI des quinolones (ciprofloxacine et acide nalidixique) étaient déterminées par E-test® et par la méthode de dilution en milieu gélosé.

La majorité des souches hautement résistantes aux quinolones présentaient la mutation thréonine-86-isoleucine dans le QRDR de la protéine GyrA. Cependant, certaines souches résistantes ou intermédiaires à l'acide nalidixique présentaient la mutation thréonine → alanine à la même position 86, alors que d'autres n'avaient aucune mutation. Aucune mutation codante n'a été identifiée dans le gène *gyrB* des souches possédant une GyrA non mutée ni même chez les souches ayant une même mutation de GyrA mais avec des CMI différentes. Le gène *parC* n'a pu être amplifié. D'un autre côté, les mutations asparagine-203-sérine et alanine-206-thréonine, dans la région C-terminale de la protéine GyrA, étaient trouvées aussi bien chez les souches sensibles que résistantes à la ciprofloxacine. Nous n'avons détecté ni intégron de classe 1 ni pompe à efflux chez les souches résistantes mais sans mutation. Mais des LPS à très longues chaînes latérales et de haut poids moléculaire étaient détectés dans la membrane externe de ces souches. La MLST a montré que les phénotypes de résistance variaient pour une même séquence type. Un échange d'allèles a été détecté entre *C. jejuni* et *C. coli*.

En conclusion, le gène *gyrB* n'est pas impliqué dans la résistance aux quinolones, et le gène *parC* semble être absent chez les *Campylobacter* spp. La présence de LPS à très longues chaînes latérales pourrait peut-être expliquer le phénotype de résistance des souches sans mutations. La MLST a montré que l'émergence de la résistance aux quinolones n'était pas liée à la diffusion d'un clone unique, mais au contraire, elle était le résultat de la pression de sélection des quinolones sur des souches de clones différents. Aussi, *C. coli* est apparu moins variable que *C. jejuni*.

**Mots clés** : *Campylobacter*, résistance, quinolones, diversité génétique

## **DEDICACES**

*Je dédie ce travail,*

*A mon père et à ma mère pour  
l'amour et l'éducation qu'ils m'ont  
donnés,*

*A mes frères et mes sœurs,*

## **REMERCIEMENTS**

*Ce travail est le fruit d'une collaboration entre l'Institut Pasteur de Dakar, la faculté des sciences et techniques, et la faculté de médecine, pharmacie et odontostomatologie de l'université Cheick Anta Diop Dakar.*

*Je remercie la direction de l'Institut Pasteur de Dakar de m'avoir accordé ce stage, et surtout pour le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.*

*Je tiens à remercier le Docteur Jean-David Perrier-Gros-Claude de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir donné l'occasion d'approfondir mes connaissances en Biologie moléculaire depuis le DEA jusqu'à la thèse. Mes remerciements pour votre rigueur scientifique et pour votre confiance.*

*Je remercie le Professeur Cheikh Saad-Bouh Boye d'avoir accepté de diriger ce travail. Votre disponibilité constante et vos compétences scientifiques forcent l'admiration de tous. Je tiens à exprimer ici l'expression de ma gratitude.*

*Je remercie le Professeur Abdoulaye SAMB, responsable des enseignements de troisième cycle. Vous avez énormément participé à ma formation à l'UCAD. Votre rigueur scientifique, la clarté de vos enseignements et vos qualités humaines m'ont fasciné. Soyez-en remercié.*

*Je tiens à remercier le Docteur Benoît Garin pour son soutien, sa disponibilité et pour tous les moyens techniques mis à ma disposition pour la réalisation de ce travail. Merci encore !!!*

*Je remercie le Docteur Mbacké Sembene d'avoir accepté de juger ce travail. Vous m'avez encadré lors de la préparation du DEA. Votre disponibilité constante, vos qualités humaines et scientifiques sont connues de tous. Soyez-en remercié.*

*Je remercie le Docteur Ngor Faye d'avoir accepté, malgré ses occupations, de juger ce travail. Vos qualités humaines et scientifiques ne sont plus à démontrer. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier le Professeur Rianatou Bada Alambédji d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail. Malgré votre emploi du temps très chargé, vous avez accepté de juger ce travail. Trouvez ici mes sincères remerciements.*

*Je remercie très sincèrement et du fond du cœur le Docteur Ibrahim Bahsoun par sa disponibilité et ses qualités humaines. Vous avez été dans toutes les étapes de la rédaction de nos publications. Trouvez ici l'expression de ma gratitude.*

*Mes remerciements vont au Docteur Sébastien Breurec pour son soutien et sa disponibilité. Vous avez participé à la réalisation de ce travail. Soyez-en remercié.*

*Je remercie le Docteur Jean-Marie Sire pour sa disponibilité et ses qualités humaines. Vous nous avez aidé dans la réalisation de ce travail. Je vous exprime toute ma reconnaissance.*

*Je remercie le Docteur Demba Sarr pour sa disponibilité et pour les corrections apportées à cette thèse. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier Modou Diagne, technicien de laboratoire, pour toute son aide technique. Votre disponibilité et vos qualités humaines nous ont marqué. Merci infiniment.*

*Je remercie le personnel du laboratoire de biologie médicale de l'Institut Pasteur de Dakar : Fatou Kiné Loum, Rokhaya Mbaye, Rougui Diallo, Armel Bissila, Yamilé Thiam, Major Cissé, Alioune Mbaye, madame Sankaré, Karim Dramé, Rose et Jean-Noel Badiane.*

*A mes frères et amis : Jean-Bruno, Issa, Omar Faye, Penda, Pacome, Hamoud, Annick, Lili, et Fabrice, Ahmed, Sami, Mame Biram Ndiaye, Babacar Dioum, Aby Sarr. Merci pour votre soutien et pour vos conseils.*

# SOMMAIRE

Introduction.....	14
GENERALITES.....	17
I. <i>Campylobacter</i> .....	18
1. Historique.....	18
2. Taxonomie.....	18
3. Caractères bactériologiques.....	19
3.1. Morphologie.....	19
3.2. Culture.....	19
3.3. Caractères biochimiques.....	19
3.4. Caractères antigéniques.....	20
4. Epidémiologie.....	20
4.1. Réservoir de la maladie.....	20
4.2. Contamination humaine.....	20
4.3. Données épidémiologiques dans le monde et au Sénégal.....	20
5. Pathologies associées aux <i>Campylobacter</i> .....	21
5.1. Entérites.....	21
5.2. Septicémies.....	21
5.3. Post-infection.....	21
6. Diagnostic bactériologique.....	22
6.1. Conditions et milieux de culture.....	22
6.2. Morphologie des colonies.....	22
6.3. Identification.....	22
6.3.1. Examen direct.....	22
6.3.2. Tests biochimiques.....	22
6.3.3. Tests sérologiques.....	23
6.3.4. PCR.....	23
7. Résistance aux antibiotiques.....	23
7.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques chez <i>Campylobacter</i> .....	24
7.2. Surveillance de la résistance aux antibiotiques chez <i>Campylobacter</i> .....	24
7.3. Mécanismes génétiques associés à la résistance aux antibiotiques.....	25

8. Typage moléculaire.....	25
. MLST.....	25
II. Quinolones, fluoroquinolones et topoisomérasés.....	26
1. Quinolones et fluoroquinolones.....	26
1.1. Structure chimique.....	26
1.2. Cible des quinolones.....	26
2. Les topoisomérasés.....	26
2.1. Clivage de l'ADN.....	28
2.2. Classification.....	28
2.2.1. Topoisomérase de type I.....	28
2.2.2. Topoisomérasés de type II.....	28
2.2.2.1. Gyrase.....	30
2.2.2.2. Topoisomérase IV.....	30
3. Mécanismes d'action des quinolones.....	31
3.1. Pénétration dans la bactérie.....	31
3.2. Action intracellulaire.....	31
4. Mécanismes de résistance.....	32
4.1. Résistance due à une altération dans les enzymes cibles .....	32
4.1.1. La gyrase.....	32
4.1.2. La Topoisomérase IV.....	33
4.1.3. Altération des enzymes cibles et résistance aux quinolones.....	33
4.1.4. Interaction des mutations de la résistance.....	34
4.2. Résistance par réduction de la perméabilité.....	34
4.2.1. Porines.....	
4.2.2. Lipopolysaccharides (LPS).....	35
4.2.3. Efflux.....	35
4.3. Intégrons.....	37
4.4. Plasmides et « <i>qnr</i> ».....	37
PARTIE EXPERIMENTALE.....	38
Présentation du travail de thèse.....	39
ETUDE 1 : Mécanismes de résistance aux quinolones.....	41
1. Matériel et méthodes.....	42
1.1. Matériel.....	42

1.1.1. Souches bactériennes.....	42
1.1.2. Milieux de culture.....	42
1.1.3. Réactifs de PCR.....	42
1.1.4. Antibiotiques.....	42
1.1.5. Kits de purification.....	42
1.1.6. Réactifs d'électrophorèse horizontale.....	43
1.1.7. Réactifs d'extraction des LPS.....	43
1.1.8. Réactifs d'électrophorèse verticale (SDS-PAGE).....	43
1.1.9. Autres matériels et consommables.....	43
1.1.10. Appareillage.....	44
1.2. Méthode.....	44
1.2.1. Récolte des échantillons.....	44
1.2.2. Recherche et isolement des <i>Campylobacter</i> .....	44
1.2.3. Identification par PCR multiplexe.....	45
1.2.3.1. Repiquage des souches.....	45
1.2.3.2. Extraction d'ADN.....	45
1.2.3.3. PCR multiplexe.....	45
1.2.3.4. Analyse des produits PCR.....	46
1.2.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	46
1.2.4.1. Méthode de diffusion des disques.....	47
1.2.4.1.1. Préparation de l'inoculum.....	47
1.2.4.1.2. Ensemencement et application des disques.....	47
1.2.4.2. Détermination des CMI par E-test®.....	47
1.2.4.2.1. Préparation de l'inoculum.....	47
1.2.4.2.2. Ensemencement et application des bandelettes E-test®.....	47
1.2.4.3. Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu gélosé.....	48
1.2.4.3.1. Culture des souches sur gélose au sang.....	48
1.2.4.3.2. Culture des souches en bouillon Brucella.....	48
1.2.4.3.3. Antibiotiques.....	48
1.2.4.3.4. Préparation des suspensions bactériennes.....	49
1.2.4.3.5. Lecture et critères d'interprétation des CMI.....	50
1.2.4.3.6. Contrôle de qualité et validation des résultats.....	50
1.2.5. Mécanismes de résistance aux quinolones.....	51
1.2.5.1. Recherche des mutations dans les topoisomérases.....	51



1.2.5.1.1. Recherche des mutations dans le gène <i>gyrA</i> .....	51
1.2.5.1.1.1. Extraction d'ADN.....	52
1.2.5.1.1.2. Amplification par PCR du QRDR du gène <i>gyrA</i> .....	52
1.2.5.1.1.3. Amplification par PCR de la région C-terminale du gène <i>gyrA</i> .....	53
1.2.5.1.2. Recherche de mutations dans le gène <i>gyrB</i> .....	53
1.2.5.1.3. Recherche de mutations dans le gène <i>parC</i> .....	54
1.2.5.2. Recherche d'intégrons de classe I .....	55
1.2.5.3. Analyse des produits PCR.....	55
1.2.5.3.1. Purification des produits issus de la PCR.....	55
1.2.5.3.2. Séquençage.....	56
1.2.5.3.3. Analyse des séquences.....	56
1.2.5.4. Analyse des composants membranaires : LPS.....	57
1.2.5.4.1. Extraction des LPS.....	57
1.2.5.4.2. Electrophorèse des LPS en gel de polyacrylamide en présence du SDS.....	58
1.2.5.4.2.1. Montage du système d'électrophorèse.....	58
1.2.5.4.2.2. Préparation des gels.....	58
1.2.5.4.2.2.1. Gel de résolution à 12,5%.....	58
1.2.5.4.2.2.2. Gel de regroupement à 3%.....	58
1.2.5.4.2.3. Préparation des échantillons.....	59
1.2.5.4.2.4. Dépôt et migration des échantillons.....	59
1.2.5.4.2.5. Détection des bandes de LPS par coloration au bleu brillant.....	60
1.2.5.4.2.5.1. Coloration au bleu brillant.....	60
1.2.5.4.2.5.2. Décoloration.....	60
1.2.5.4.2.5.3. Séchage du gel.....	60
2. Résultats.....	61
2.1. Phénotypes de résistance et CMI.....	61
2.2. Mutations du QRDR de la protéine GyrA.....	62
2.3. Mutations des gènes <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , et hors QRDR du gène <i>gyrA</i> .....	65
2.4. Recherche des intégrons de classe I.....	66
2.5. Composants membranaires.....	66
3. Discussion.....	68
4. Conclusion.....	71
ETUDE 2 : Emergence des souches résistantes et étude de leur diversité.....	72

Introduction.....	73
1. Matériel et méthodes.....	73
1.1. Matériel.....	73
. Souches bactériennes.....	73
1.2. Méthodes.....	73
1.2.1. MLST.....	73
. Principe.....	73
1.2.2. Extraction d'ADN.....	74
1.2.3. Amplification des gènes par PCR.....	74
1.2.4. Electrophorèse des produits issus de la PCR.....	76
1.2.5. Purification des produits issus de la PCR.....	76
1.2.6. Séquencage.....	76
1.2.7. Analyse des séquences.....	76
1.2.7.1. Identification des allèles et des séquences types (ST).....	77
1.2.7.2. Identification des lignées et complexes clonaux.....	80
2. Résultats.....	81
2.1. Allèles.....	81
2.2. Séquences types (ST).....	81
2.3. Lignées.....	84
2.4. Relation entre ST, phénotype de résistance et mutation du gène <i>gyrA</i> .....	87
3. Discussion.....	89
4. Conclusion.....	92
Conclusion générale et perspectives.....	93
Références bibliographiques.....	94
Annexes.....	103
Publications.....	106

## **ABBREVIATIONS**

ADN : Acide désoxyribonucléique  
ACE : Acétate  
APS : Ammonium persulfate  
Arg : L-arginine-4-méthoxy- $\beta$ -naphtylamide  
AspA : Acide aspartique- $\beta$ -naphtylamide  
CFZ : Céfazoline  
CMI : Concentration minimale inhibitrice  
CIT : Citrate  
ERO : Erythromycine  
EST : Estérase  
 $\gamma$ GT : Gamma-glutamyl-transférase  
HIP : Hippurate  
LPS : Lipopolysaccharide  
MLST : Multilocus sequence typing  
MLT : Malate  
NAL : Acide nalidixique  
NIT : Réduction des nitrates  
PAL : Phosphatase alcaline  
Pb : pair de bases  
PCR : polymerase chain reaction  
PFGE : Pulsed field gel electrophoresis  
PROP: Propionate  
PyrA : acide pyroglutamique- $\beta$ -naphtylamide  
QRDR : quinolone-resistance determining region  
ST : Séquence type  
SUT : Succinate  
TAE : Tris-Acide acétique-EDTA  
TE : Tris EDTA  
TTC : chlorure de triphényl-tétrazolium  
URE : Uréase

## **LISTE DES FIGURES**

- Figure 1. Morphologie des *Campylobacter*
- Figure 2. Structure chimique des quinolones
- Figure 3. Cassure d'un brin d'ADN par une attaque nucléophile d'un oxygène d'une tyrosine
- Figure 4. Clivage double-brin d'un segment d'ADN par une topoisomérase II
- Figure 5. Comparaison des séquences des topoisomérases
- Figure 6. Différents systèmes d'efflux chez *E. coli*
- Figure 7. Présentation schématique des régions amplifiées du gène *gyrA*.
- Figure 8. Amplification par PCR des gènes *gyrA* de *C. jejuni* et *C. coli*.
- Figure 9. Comparaison des séquences d'ADN
- Figure 10. Comparaison des séquences protéiques
- Figure 11. Electrophorèse verticale des LPS sur gel de polyacrylamide en présence du SDS
- Figure 12. Présentation schématique des régions amplifiées- MLST
- Figure 13. Fenêtre de la base MLST pour la détermination des allèles
- Figure 14. Fenêtre de la base MLST pour la détermination des ST
- Figure 15. Amplification par PCR de 7 gènes pour la MLST *C. coli*.
- Figure 16. Relation entre les souches du complexe ST-353 et celles de génotype ST1040 par l'analyse eBURST. La ST1036 est l'ancêtre de la ST1040.

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I. Caractères biochimiques des espèces *C. jejuni* et *C. coli*

Tableau II. Amorces de PCR pour l'identification des espèces.

Tableau III. Phénotypes et diamètres critiques proposés pour la ciprofloxacine et l'acide nalidixique

Tableau IV. Phénotypes et CMI critiques de la ciprofloxacine et de l'acide nalidixique

Tableau V. Gammes de concentrations des antibiotiques testés.

Tableau VI. CMI critiques des antibiotiques

Tableau VII. CMIs référencées par le NCCLS

Tableau VIII. Amorces utilisées pour amplifier les gènes des topoisomérases

Tableau IX. Amorces utilisées pour détecter les intégrons de classe 1

Tableau X. CMI et phénotypes de résistance des souches de *C. jejuni*

Tableau XI. CMI et phénotypes de résistance des souches de *C. coli*

Tableau XII. CMI et mutations de GyrA chez *C. jejuni*

Tableau XIII. CMIs et mutations de GyrA chez *C. coli*.

Tableau XIV. Mutations dans et hors QRDR de GyrA

Tableau XV. Profils des LPS observés dans les souches sans mutation

Tableau XVI. Amorces pour la MLST de *C. jejuni*

Tableau XVII. Amorces pour la MLST de *C. coli*

Tableau XVIII. Amorces pour séquençage MLST-*C. jejuni*

Tableau XIX. Taille des régions analysées par la MLST.

Tableau XX. Nombre d'allèles et de sites variables.

Tableau XXI. Profils alléliques et ST des souches de *C. jejuni*

Tableau XXII. Profils alléliques et ST des souches de *C. coli*.

Tableau XXIII. Lignées, mutations du gène *gyrA* et phénotypes de résistance des souches de *C. jejuni*

Tableau XXIV. Lignées, mutations du gène *gyrA* et phénotypes de résistance des souches de *C. coli*.

## Introduction

*Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sont une cause majeure de gastro-entérite chez l'homme dans les pays développés (Blaser, 1997). Dans les pays en voie de développement, l'incidence des diarrhées à *Campylobacter* se situe entre 40.000 et 60.000 /100.000 chez les enfants âgés de moins de 5 ans, et 90/100.000 dans la population générale (Butzler, 2004 ; Coker et al., 2002 ; Rao et al., 2001). Plusieurs études ont montré, grâce au phénotypage et au génotypage, que la volaille est la principale source d'infection à *Campylobacter* chez l'homme (Hanninen et al., 2000 ; Moore et al., 2003). L'homme se contamine par ingestion d'aliments souillés comme la viande de volaille et les produits à base de viande insuffisamment cuits.

L'entérite à *Campylobacter* est généralement une maladie bénigne, spontanément résolutive, qui n'exige habituellement pas de thérapie antimicrobienne. Toutefois, le recours aux antibiotiques est indiqué dans les cas d'infections sévères chez les personnes à risques comme les enfants ou les patients immunodéprimés, spécialement en Afrique où le SIDA a atteint des proportions épidémiques. Dans le passé, l'érythromycine a été l'antibiotique de choix pour les infections à *Campylobacter*, mais depuis quelques années, on utilise de plus en plus les fluoroquinolones pour traiter les gastro-entérites dues aux *Campylobacter* spp.

Les fluoroquinolones ont été largement utilisées pendant les années 90 pour traiter les infections bactériennes en médecine vétérinaire. Chez les *Campylobacter* spp., la résistance aux fluoroquinolones est en augmentation partout dans le monde, et elle serait liée à l'introduction de ces molécules en médecine vétérinaire (Engberg et al., 2001). Au Sénégal, les fluoroquinolones (enrofloxacin et norfloxacin) ont été introduites dans la filière aviaire en 1996 (Cardinale et al., 2003). L'incidence des *Campylobacter* résistants à ces antibiotiques chez le poulet atteint 40% des souches isolées (Cardinale et al., 2003).

Chez les *Campylobacter* spp., la résistance aux quinolones est liée à la présence de mutations dans une région du gène *gyrA* appelée « quinolone-resistance determining region (QRDR) » entre les codons 70 et 109 (Wang et al., 1993 ; Piddock et al., 2003). Ce gène code pour une enzyme, la gyrase, impliquée dans la réplication de l'ADN. Le mécanisme de résistance prédominant aux quinolones est donc lié à la mutation cytosine→thymine au codon 86 dans le QRDR du gène *gyrA*, entraînant la substitution de la thréonine par l'isoleucine (thréonine-86-isoleucine) dans la sous-unité A de l'enzyme ADN gyrase (GyrA) (Wang et al.,

1993 ; Bachoual *et al.*, 2001). D'autres mutations ont été décrites aux codons 70, 90 et 104 chez les souches cliniques et/ou chez les mutants de laboratoire (Wang *et al.*, 1993 ; Piddock *et al.*, 2003 ; Bachoual *et al.*, 2001). Cependant, ces mutations ont été rarement décrites ensemble dans le QRDR de la protéine GyrA. Aussi, la mutation thréonine-86-isoleucine confère différents niveaux de résistance aux quinolones c'est-à-dire que chez les souches ayant cette mutation les concentrations minimales inhibitrices (CMI) varient grandement (Piddock *et al.*, 2003 ; Griggs *et al.*, 2005), ce qui laisse penser que d'autres facteurs agiraient sur la CMI finale. D'un autre côté, des souches résistantes aux quinolones mais sans mutation dans le QRDR de GyrA avaient été déjà décrites (Piddock *et al.*, 2003). Pour expliquer la variabilité des CMI des quinolones pour une même mutation, et l'existence des souches résistantes aux quinolones mais sans mutation dans le QRDR de GyrA, il a été suggéré que d'autres mutations situées hors du QRDR de GyrA et/ou dans d'autres topoisomérases agiraient sur la CMI finale. En effet, chez *Escherichia coli* et d'autres bactéries Gram négatif, la présence d'une seule mutation dans le QRDR de la protéine GyrA n'entraîne qu'une résistance à l'acide nalidixique. Pour atteindre des CMI très élevées et une résistance aux fluoroquinolones, d'autres mutations sont indispensables dans le QRDR de GyrA, dans celui de GyrB et dans la topoisomérase IV (gènes *parC*, *parE*) (Friedman *et al.*, 2001 ; Hopper *et al.*, 1999 ; Ruiz, 2003). Mais à ce jour, aucune mutation du gène *gyrB* n'a été associée à la résistance aux fluoroquinolones chez les *Campylobacter* spp (Piddock *et al.*, 2003 ; Griggs *et al.*, 2005), et le rôle des mutations du gène *parC* décrites antérieurement par Gibreel *et al.* (1998) n'a pas été confirmé par d'autres études (Bachoual *et al.*, 2001 ; Payot *et al.*, 2002 ; Griggs *et al.*, 2005).

Le rôle des pompes à efflux dans la résistance des souches de *Campylobacter* spp. aux quinolones a été déjà démontré (Luo *et al.*, 2003 ; Ge *et al.*, 2005). D'autres facteurs tels que les couches de lipopolysaccharides (LPS) peuvent aussi altérer la perméabilité membranaire aux antibiotiques (Nikaido & Vaara, 1985). A ce jour, aucun intégron de classe I n'a été impliqué dans la résistance aux quinolones.

Plusieurs techniques ont été développées ces dernières années pour étudier l'émergence et la diversité des souches résistantes aux antibiotiques. La « *Multilocus Sequence Typing* (MLST) » est la technique la plus récente (Dingle *et al.*, 2001 ; Dingle *et al.*, 2005). L'intérêt d'une telle démarche est par exemple de savoir si l'émergence de la résistance est liée à la diffusion d'un seul clone ou au contraire plusieurs clones différents. La MLST est une technique qui utilise les variations génétiques au sein de plusieurs gènes, et permet la génération des séquences d'ADN qui peuvent être disponibles via une banque de données, facilitant ainsi la comparaison avec les séquences des souches d'autres pays.

Le but de ce travail était :

- d'explorer les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones des souches de *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* isolées au Sénégal à savoir : la recherche des mutations dans la topoisomérase II (gyrase) cible principale des quinolones, l'implication des mutations de GyrB, de la topoisomérase IV (*parC*) et des mutations situées hors du QRDR de GyrA dans l'élévation des CMI, mais aussi de rechercher la présence des intégrons de classe 1, et d'étudier le rôle éventuel des pompes à efflux et des LPS.
- l'émergence et la diversité des souches résistantes aux quinolones par la technique « MLST ».



## **GÉNÉRALITÉS**

# **I. *Campylobacter***

## **1. Historique**

Les *Campylobacter* ont pendant longtemps été des bactéries connues dans le domaine vétérinaire principalement dans les diarrhées et les avortements chez les moutons. En médecine humaine, il a fallu attendre le développement des milieux sélectifs notamment pour l'isolement des *Campylobacter* dans les selles. C'est seulement dans ces 30 dernières années que ces organismes ont été reconnus comme étant une cause majeure de pathologie humaine (Moore et al. 2005).

Les *Campylobacter* auraient été observés pour la première fois dans les prélèvements diarrhéiques des nouveau-nés en Allemagne vers 1880. Mais la première identification reconnue est attribuée à Mc Fadyen et Stockman en 1913 en association avec les avortements des moutons (Moore & Matsuda, 2002). Des tests de confirmation seront réalisés par Smith en 1918 quand des organismes similaires seront isolés des fœtus avortés des bovins (Moore & Matsuda, 2002). Ces organismes étaient à l'origine assignés au genre *Vibrio* à cause de leur forme spiralée, d'où d'ailleurs leur désignation sous le terme de *Vibrio fetus* par Smith. Cependant, ce n'est qu'en 1947 que l'infection humaine sera associée pour la première fois aux vibrions microaérophiles, lesquels étaient associés à une infection maternofoetale pouvant entraîner la mort du fœtus. En 1957, Elizabeth King proposa deux types de vibrions microaérophiles liés à l'entérite : le premier était *V. fetus*, et le second, un vibrion thermophile dans sa nature. Ce n'est qu'en 1963 que le genre *Campylobacter* (signifiant « baguette recourbée ») sera proposé car contrairement aux bactéries du genre *Vibrio* la bactérie ne pouvait pas utiliser les sucres et avait un pourcentage de G+C différent. Les travaux de King seront corroborés plus tard par ceux de Dekeyser et Butzler en 1972 quand les méthodes d'isolement des *Campylobacter* thermophiles seront développées (Moore et al., 2005 ; Moore & Matsuda, 2002). En 1977, Skirrow développa une technique de culture simple et directe des selles sur de la gélose au sang contenant de la vancomycine, polymyxine et la triméthoprime (Skirrow & Blaser, 2000). Depuis lors, plusieurs modifications ont été apportées, permettant ainsi l'adoption universelle de ces méthodes et leurs variants, lesquelles permettent maintenant aux laboratoires d'analyses cliniques et de recherche d'isoler les *Campylobacter* dans les selles.

## **2. Taxonomie**

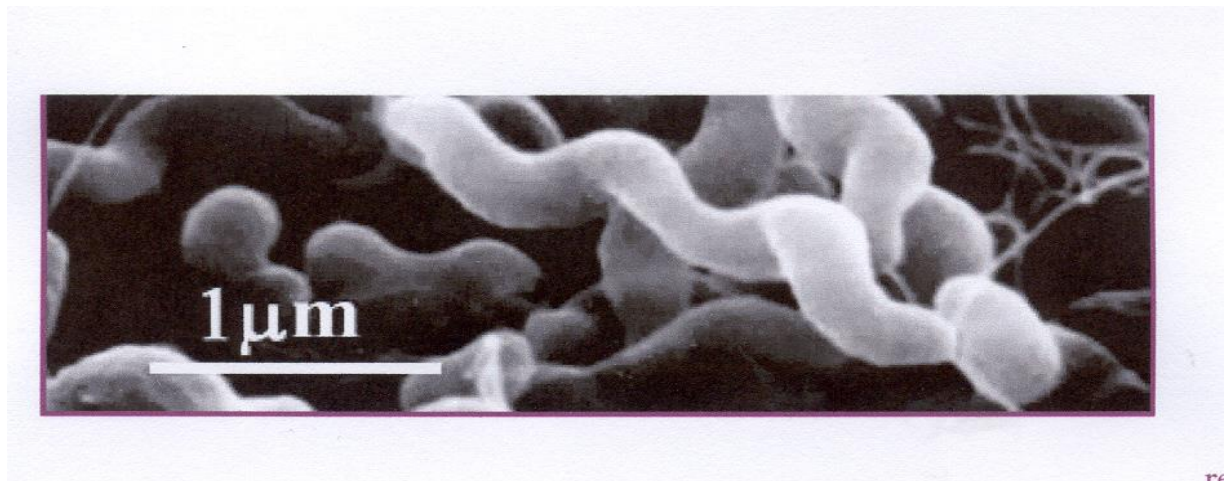
Actuellement, le genre *Campylobacter* constitue avec le genre *Arcobacter* la famille des *Campylobacteraceae* placée dans la « superfamille VI » de la classe des *Proteobacteria*, sous-

division epsilon. Dix sept espèces et 6 sous-espèces sont assignées au genre *Campylobacter* dont les plus fréquemment rapportées en pathologie humaine sont *C. jejuni* et *C. coli* (Euzéby, 1998).

### 3. Caractères bactériologiques

#### 3.1. Morphologie

Le genre *Campylobacter* est constitué de bacilles à Gram négatif, incurvés ou en forme de S ou de forme spiralée, non sporulés, de 0,2 à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 0,5 à 5,0  $\mu\text{m}$  de longueur (Figure 1). Ils peuvent donner des formes coccoïdes dans les vieilles cultures et ont une mobilité en « vol de moucheron » grâce à un flagelle nu situé à une extrémité ou aux deux extrémités de la cellule (Vandamme & De Ley, 1991).



**Figure 1.** Morphologie des *Campylobacter* spp.

(Extrait de <http://www.techmicrobio.net/systematique/GramNegatif/Campylobacter/Campylobacter.html>) (Dernière visite, le 30 Mai 2006).

#### 3.2. Culture

Les *Campylobacter* spp. ne poussent qu'en atmosphère microaérophile (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>), à une température de 37 jusqu'à 42°C (pour les espèces thermophiles) sur un milieu gélosé enrichi au sang (Ferron, 1989). A l'exception de *C. mucosalis* et *C. hyointestinalis* qui produisent un pigment jaunâtre, les colonies de *Campylobacter* sont non pigmentées.

#### 3.3. Caractères biochimiques

Les *Campylobacter* spp. sont des bactéries chimio-organotrophes, à métabolisme respiratoire, incapables d'utiliser les sucres, oxydase positive, catalase variable, n'hydrolysant ni

la gélatine ni l'urée (à l'exception de quelques souches atypiques de *C. lari* et des souches de *C. sputorum* biovar *paraureolyticus*) et dépourvues de lipase.

### **3.4. Caractères antigéniques**

Deux types d'antigènes ont été décrits chez *C. jejuni* (Ferron, 1989):

- un antigène thermolabile de nature protéique correspondant en partie au flagelle.
- un antigène thermostable de nature lipopolysaccharidique.

Des études récentes ont montré que plusieurs souches de *C. jejuni* présentent un polysaccharide capsulaire de haut poids moléculaire et thermostable qui jouerait un rôle dans la pathogénicité de cette espèce (Karlyshev & Wren, 2001).

D'après leurs structures antigéniques, *C. jejuni* diffère de *C. coli* par la présence de la protéine MAPA exclusivement chez *C. jejuni* (Stuki et al., 1995).

## **4. Epidémiologie**

### **4.1. Réservoir de la maladie**

Les *Campylobacter* sont des agents commensaux du tube digestif des oiseaux et des mammifères. Les volailles constituent le réservoir principal (porteurs sains au niveau du tube digestif) de la maladie (Skirrow, 1994).

### **4.2. Contamination humaine**

L'homme se contamine par ingestion d'aliments souillés comme la viande et les produits à base de viande insuffisamment cuits, le lait non pasteurisé et l'eau (Anonymous, 2002). Les contaminations interhumaines sont peu fréquentes. Les infections à *Campylobacter* sont pour la plupart sporadiques.

### **4.3. Données épidémiologiques dans le monde et au Sénégal.**

Les *Campylobacter* sont une cause importante de gastroentérite dans les pays développés. Aux USA, les *Campylobacter* sont responsables d'environ 2,4 millions de cas de gastroentérite par an (Friedman et al., 2000 ; Meads et al., 1999).

Dans les pays en voie de développement, l'incidence des diarrhées à *Campylobacter* se situe entre 40.000 et 60.000/100.000 chez les enfants de moins de 5 ans, et 90/100.000 dans la population générale (Coker et al., 2002 ; Rao et al., 2001).

Au Sénégal, il y a très peu de données sur l'épidémiologie des infections à *Campylobacter*. En effet, beaucoup de malades souffrant de diarrhée ne consultent pas un

médecin. Les seules données disponibles concernent la filière aviaire et indiquent que l'incidence des *Campylobacter* résistants aux quinolones peut atteindre 40% (Cardinale et al. 2003).

## **5. Pathologies associées aux *Campylobacter***

Aujourd'hui l'épidémiologie des infections à *Campylobacter* est connue pour deux pathologies : les entérites et les septicémies.

### **5.1. Entérites**

Les *Campylobacter* thermophiles (*C. jejuni*/*C. coli*) sont l'une des causes les plus fréquentes d'infections intestinales dans le monde (Moore et al., 2005). Le symptôme principal est la diarrhée qui peut être sanguinolente. Les douleurs abdominales sont assez fréquentes, par contre les vomissements sont rares. La fièvre, les maux de tête, l'asthénie, et l'anorexie sont aussi présentes et peuvent précéder la diarrhée (Mégraud & Gavinet, 1989). Les *Campylobacter* sont des bactéries entéroinvasives. Normalement, la maladie se développe 2 à 3 jours après l'ingestion des aliments souillés, mais les symptômes de l'infection disparaissent spontanément au bout d'une semaine. Le traitement est efficace s'il est administré très tôt au début de la maladie ce qui permet de réduire la durée de la maladie (Salazar-Lindo, 1986). L'antibiotique recommandé est l'érythromycine ou une fluoroquinolone. Cependant, les sujets dont le système immunitaire est affaibli par une maladie sous-jacente (SIDA, diabète, cirrhose, cancer) peuvent développer une infection sévère. En effet, il a été démontré que le risque d'une infection à *Campylobacter* était multiplié par 40 quand le sujet était VIH positif (Sorvillo et al., 1991).

### **5.2. Septicémies**

La fréquence des septicémies détectées dans le cas des infections à *Campylobacter* est très faible (0,1%) comparée à celles associées aux salmonelles (Skirrow, 1993). La principale espèce responsable est *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

### **5.3. Post-infection**

La plus importante des manifestations post-infectieuses est le syndrome de Guillain-Barré (Smith, 1995). Dans 30 à 50% des cas de syndrome de Guillain-Barré, des stigmates sérologiques d'infection à *C. jejuni* sont retrouvés.

## **6. Diagnostic bactériologique**

### **6.1. Conditions et milieux de culture**

Les *Campylobacter* croissent bien sur gélose au sang. Cependant, l'ensemencement des échantillons polymicrobiens comme les selles nécessite des milieux très sélectifs. Les échantillons d'origine alimentaire, qui en général contiennent moins de *Campylobacter*, nécessitent une étape de pré-enrichissement avant leur isolement sur gélose au sang. La culture nécessite une incubation à 37 ou 42°C dans une atmosphère microaéroophile.

### **6.2. Morphologie des colonies**

La lecture est effectuée après 48 heures d'incubation. Les colonies sont non hémolytiques et en « tache de bougie », colonies envahissantes le long des stries d'ensemencement.

### **6.3. Identification**

#### **6.3.1. Examen direct**

- L'examen microscopique du prélèvement à l'état frais est souvent évocateur d'une très grande mobilité des *Campylobacter* avec un aspect « en vol de moucheron »
- Coloration de Gram. Les *Campylobacter* apparaissent comme des bacilles roses pâles, fins, incurvés ou en forme de virgule. Les cultures évoluent rapidement vers des formes de dégénérescence d'aspect coccoïde.

#### **6.3.2. Tests biochimiques**

La galerie API CAMPY (Biomérieux) est facile à utiliser mais la base de données ne répertorie pas tous les taxons. Elle explore :

- la présence d'enzymes (uréase, nitrate réductase, estérase, esculinase, hippurate, gamma glutamyl transférase, arylamidase, la phosphatase alcaline)
- la production de H<sub>2</sub>S
- l'auxanogramme de différentes sources de carbone (tests d'assimilation) : D-glucose, succinate de sodium, acétate de sodium, acide propionique, acide malique, trisodium citrate. Le tableau 1 résume les caractères biochimiques des espèces *C. jejuni* et *C. coli*.
- la croissance en présence d'inhibiteurs : céfazoline, acide nalidixique et érythromycine.

**Tableau I.** Caractères biochimiques des espèces *C. jejuni* et *C. coli*

	URE	NIT	EST	HIP	GGT	TTC	PyrA	ArgA	AspA	PAL	H <sub>2</sub> S
<i>C. jejuni</i> ATCC 49943	-	+	+	+	+	+	v	-	-	+	-
<i>C. coli</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-

	GLU	SUT	NAL	CFZ	ACE	PROP	MLT	CIT	ERO	CAT
<i>C. jejuni</i> ATCC 49943	-	+	-	+	-	-	v	-	-	+
<i>C. coli</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+

(+) : positif

(-) : négatif

### 6.3.3. Tests sérologiques

Les techniques sérologiques ayant recours à des billes de latex recouvertes d'anticorps sont utilisées sur des bactéries isolées (la sensibilité de détection est insuffisante lorsque ces techniques sont mises en œuvre sur des selles ou des denrées alimentaires) et elles ne permettent qu'un diagnostic d'orientation.

### 6.3.4. PCR

L'identification du genre et des espèces est couramment faite par PCR. C'est une technique d'amplification génique *in vitro* (Bogard & Lamoril, 1998). Plusieurs variantes de cette technique sont actuellement disponibles. Cette technique sera présentée plus en détail dans la deuxième partie de notre travail.

## 7. Résistance aux antibiotiques

La majorité des entérites à *Campylobacter* ne nécessite pas de thérapie antimicrobienne (Allos, 1995). Cependant, dans les cas sévères ou de maladie récidivante, les tests de sensibilité sont importants pour assurer un traitement adéquat (Avrain, 2003 ; Rautelin et *al.*, 2002). Les macrolides restent les antibiotiques de choix, la résistance à l'érythromycine reste très faible (Nachamkim et *al.*, 2000). Les fluoroquinolones, très efficaces contre les bactéries entériques, sont utilisées pour traiter les diarrhées bactériennes graves, la ciprofloxacine étant largement utilisée chez les voyageurs (Gibreel et *al.*, 1998). L'émergence de la résistance à ces molécules rend leur efficacité moins certaine. La résistance a été rapportée chez certains patients après un traitement aux fluoroquinolones (Bacon et *al.*, 2000), et coïncidait avec l'introduction de ces molécules en médecine vétérinaire (Endtz et *al.*, 1991 ; Aatestrup & Engberg, 2001). Cependant, un nombre croissant des souches de *Campylobacter* résistantes à ces antibiotiques sont actuellement isolées dans plusieurs pays, à la fois dans les échantillons humains et

alimentaires. En effet, depuis les années 1990, la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones augmente, et est reconnue comme étant un problème émergent de santé publique dans plusieurs pays européens (Engberg et *al.*, 2001). L'entrée des souches résistantes dans la chaîne alimentaire pourrait constituer une menace pour la santé humaine.

### **7.1. Sensibilité aux antibiotiques chez les *Campylobacter* spp.**

Plusieurs méthodes parmi lesquelles la méthode de diffusion des disques, la méthode de dilution en milieu gélosé et le « Epsilometer-test (E-test<sup>®</sup>, AB Biodisk, Sweden) », avaient été développées pour déterminer les profils de sensibilité *in-vitro* des *Campylobacter* à une gamme d'antibiotiques (Engberg et *al.*, 1999 ; Gaudreau & Gilbert, 1997). Plusieurs auteurs ont comparé la performance de ces méthodes, et ont rapporté une corrélation entre le E-test et la méthode de dilution en milieu gélosé (Ge et *al.*, 2002). Le E-test, très pratique, relativement simple à utiliser, donne des CMI's légèrement inférieures à celles obtenues par la méthode de dilution en milieu gélosé (Ge et *al.*, 2002). Une combinaison de ces méthodes permet d'évaluer correctement les CMI's. Les méthodes moléculaires sont une alternative aux tests de sensibilité. Pour les quinolones, de nombreuses méthodes ont été développées pour la recherche des souches résistantes à ces molécules puisque possédant le plus souvent la même mutation (thréonine-86-isoleucine) (Piddock et *al.*, 2003 ; Zirnstein et *al.*, 1999). Cependant, ces méthodes présentent un inconvénient : elles deviennent inopérantes en cas de présence d'un mécanisme inhabituel de résistance.

### **7.2. Surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les *Campylobacter* spp.**

La transmission de la résistance aux antibiotiques de l'animal à l'homme peut se faire via les aliments (Pezzotti et *al.*, 2003 ; Putnam et *al.*, 2003). Les animaux constituent un réservoir important des souches résistantes aux antibiotiques. L'utilisation des antibiotiques dans le domaine vétérinaire, à la fois pour traiter les infections et comme promoteurs de croissance, est une cause importante de l'émergence de la résistance. Les suppléments alimentaires contenant des antibiotiques constitueraient plus de la moitié des antibiotiques utilisés dans le monde (Wegener et *al.*, 1999).

Pendant plusieurs décennies, les antibiotiques du groupe macrolides-lincosamides ont été utilisés pour traiter les animaux d'élevage (contrôle de dysenteries et d'infections à mycoplasmes chez le porc). L'utilisation des macrolides comme promoteurs de croissance a été interdite en Europe en 1999. Les fluoroquinolones sont encore utilisées dans beaucoup de pays à cette même fin. Au Sénégal, les fluoroquinolones (enrofloxacin et norfloxacin) ont été



introduites dans la filière avicole en 1996 pour traiter les infections intestinales et respiratoires (Cardinale et *al.*, 2003). L'incidence des *Campylobacter* résistants à ces molécules atteindrait les 40% (Cardinale et *al.*, 2003).

### **7.3. Mécanismes génétiques associés à la résistance aux antibiotiques chez les *Campylobacter* spp.**

Les populations bactériennes peuvent répondre à l'action d'un antibiotique en développant un certain nombre de mécanismes de résistance (Rowe-Magnus et *al.*, 2002). La pression sélective des antibiotiques aboutit au développement de déterminants de résistance spécifique à l'antibiotique soit par modification intrinsèque des cibles soit par acquisition de gènes. Par exemple, une sélection à la suite d'un traitement à l'enrofloxacin des poulets infectés par les *Campylobacter* (sensibles aux fluoroquinolones) aboutit à l'émergence des *Campylobacter* résistants à cet antibiotique, suggérant que cet organisme est hypermutable sous ces conditions (Luo et *al.*, 2003). Les modifications intrinsèques des gènes (par mutations), transfert horizontal des déterminants de résistance (acquisition) et bien d'autres événements génétiques (gène *qnr* codant pour un pentapeptide répété qui protégerait la gyrase de l'action des quinolones) constituent les principaux mécanismes contribuant à la résistance bactérienne. (Voir partie quinolones pour les autres mécanismes).

## **8. Typage moléculaire**

La caractérisation de lignées de bactéries résistantes aux antibiotiques mais aussi la surveillance globale des épidémies nécessitent une comparaison directe des souches de différentes localités. Malheureusement beaucoup de méthodes actuelles de typage (PFGE par exemple) sont mal adaptées pour ce type de comparaison car elles exigent une standardisation dans chaque laboratoire et dépendent de réactifs spécialisés. Les méthodes basées sur les séquences d'ADN sont plus convenables car elles permettent une comparaison directe des souches typées dans différentes régions du monde (Maiden et *al.*, 1998). C'est le cas de la « *Multilocus Sequence Typing (MLST)* » qui est la méthode la plus récente.

### **8.1. *Multilocus Sequence Typing (MLST)***

La MLST est un nouveau système de typage basé sur les séquences d'ADN. Cette méthode nécessite le séquençage de 7 régions internes (d'environ 500 paires de base chacune) de gènes, et a été développée pour plusieurs bactéries pathogènes dont *Campylobacter* spp (Dingle et *al.*, 2001 ; Dingle et *al.*, 2005).

## **II- Quinolones, fluoroquinolones et topoisomérases**

### **1. Quinolones et fluoroquinolones**

#### **1.1. Structure chimique**

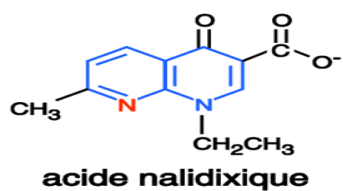
Les quinolones sont des molécules obtenues par synthèse chimique, qui dérivent d'acides carboxyliques hétérocycliques diversement substitués. Toutes les quinolones actuelles présentent une structure bicyclique, avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4. Les fluoroquinolones, ainsi appelées car contenant un atome de fluor en position 6, dérivent de la quinoléine. Les fluoroquinolones de première génération portent en position 7 un cycle à 6 atomes. Celles de deuxième génération présentent dans la même position un cycle plus petit diversement substitué (Figure 2). En plus de l'acide nalidixique, la première molécule de la classe des quinolones ne contenant pas de fluor, plusieurs autres molécules sont actuellement utilisées en médecine clinique (Hopper, 1999).

#### **1.2. Cible des quinolones**

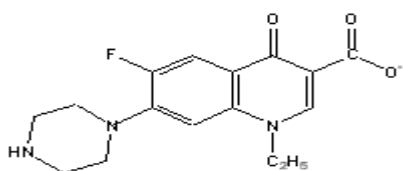
Les quinolones ont pour cibles deux enzymes de la classe des topoisomérases : la gyrase et la topoisomérase IV.

### **2. Les topoisomérases**

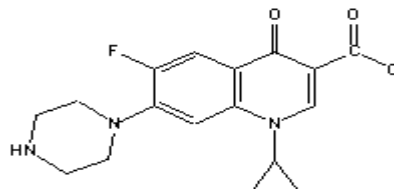
Ce sont des acteurs de la régulation de la topologie de l'ADN. Elles sont capables de catalyser l'interpénétration de simple brin ou de double brin d'ADN. Elles peuvent ainsi changer l'indice d'enlacement d'une molécule d'ADN, mais aussi les décaténer et les dénouer. Depuis la mise en évidence de la première topoisomérase en 1971 (Wang, 1971), ces enzymes ont été identifiées chez tous les organismes vivants. Elles sont en effet essentielles à la viabilité de la cellule (Froelich-Ammon & Osheroff, 1995). L'action simultanée des différentes topoisomérases au sein d'un même organisme, assure le maintien du degré de super-enroulement, la séparation des chromosomes et empêche la formation des nœuds.



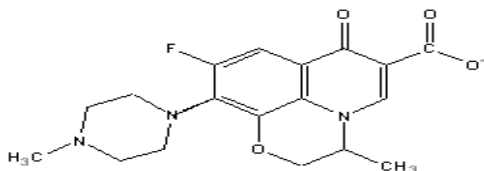
« Quinolones de première génération »



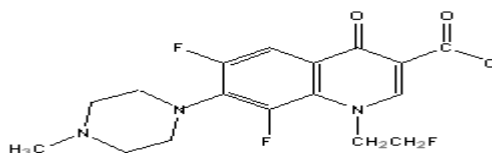
Norfloxacine



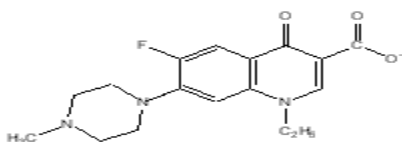
Ciprofloxacine



Ofloxacine

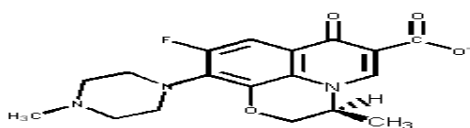


Fléroxacine

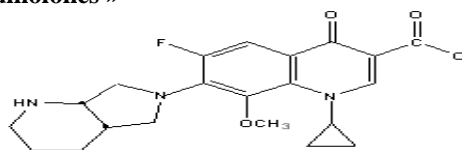


Péfloxacine

« Nouvelles quinolones »



Lévofloxacine



Moxifloxacine

**Figure 2.** Structure chimique des quinolones (Hopper, 1999).

## **2.1. Clivage de l'ADN**

Modifier l'état d'enroulement de l'ADN en effectuant le passage d'un simple brin ou d'un double brin à travers un autre nécessite un clivage d'au moins l'un des deux brins dans la molécule. Quelles que soient les topoisomérases, la réaction de cassure s'effectue par une attaque nucléophile d'un oxygène d'une tyrosine de l'enzyme sur un groupement phosphate du squelette de l'ADN (Wang, 2002). Ainsi, il se forme une liaison phosphodiester covalente temporaire entre l'enzyme et l'ADN (Figure 3). A l'issue de la réaction d'isomérisation, le sens de cette transestérification est inversée et permet de retrouver l'intégrité du squelette de l'ADN.

## **2.2. Classification**

Suivant leur mécanisme et leur structure, on distingue deux classes de topoisomérases : les topoisomérases de type I et celles de type II.

### **2.2.1. Topoisomérases de type I**

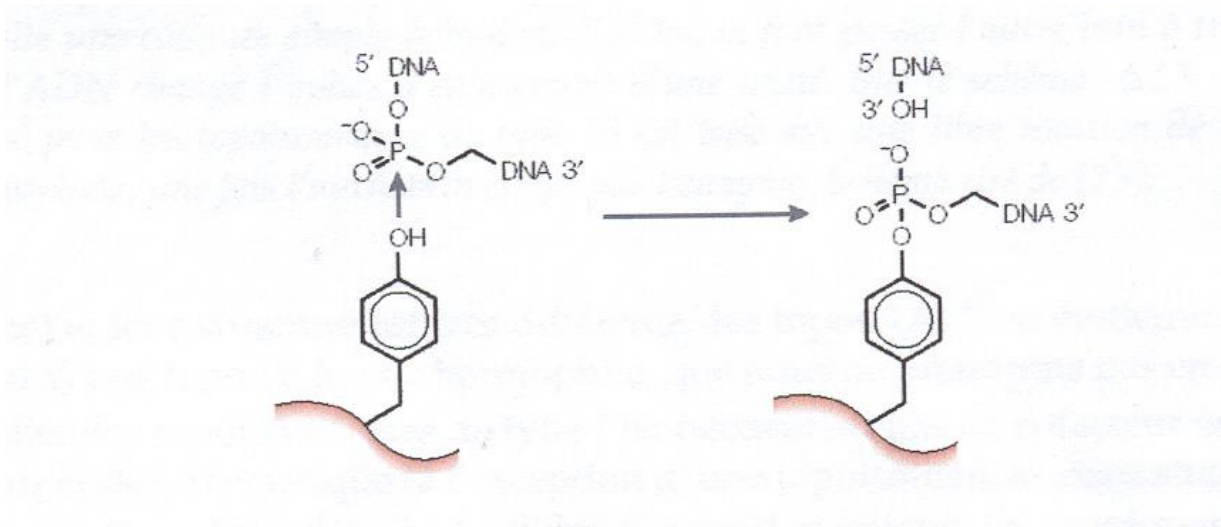
Les topoisomérases de type I (que nous ne développerons pas ici) sont monomériques, effectuent des coupures simple brin dans l'ADN, ce qui entraîne soit le passage (ATP-indépendant) de l'autre brin à travers la coupure simple brin (pour les enzymes de type IA), soit la libre rotation autour de l'autre simple brin (pour les enzymes de type IB, lesquelles n'existent que chez les eucaryotes).

Il existe généralement deux topoisomérases de type I chez les bactéries : la topoisomérase 1 et la topoisomérase 3.

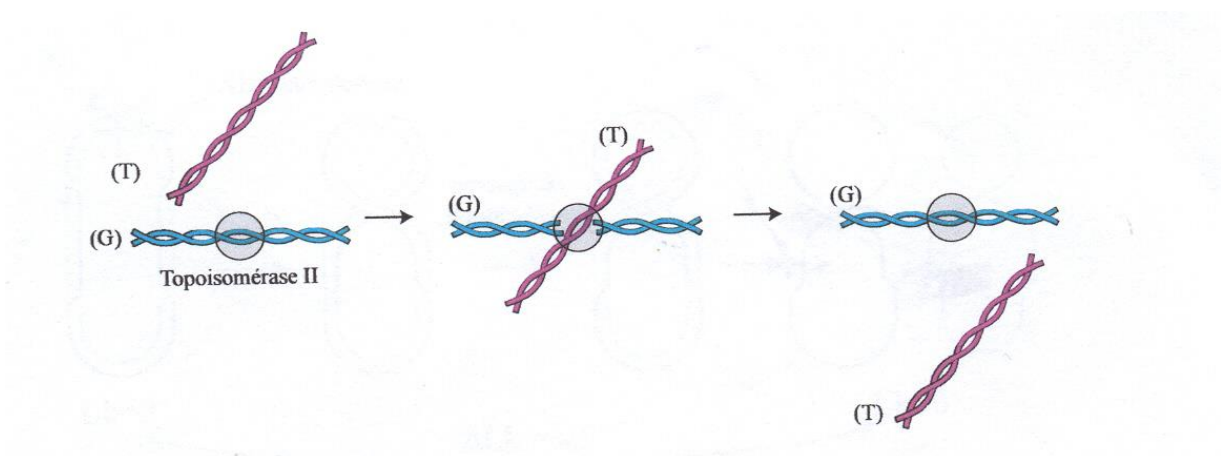
### **2.2.2. Topoisomérases de type II**

Ce sont toujours des dimères ou tétramères qui effectuent un clivage double-brin dans un segment d'ADN appelé segment G (pour Gate). Cette coupure est opérée par deux groupements tyrosines (appartenant à deux sous-unités identiques de l'enzyme) sur chaque squelette de la molécule d'ADN. Cette coupure permet le passage au travers du segment G de l'autre segment de l'ADN, appelé segment T (pour Transport), comme le montre la figure 4.

Le fonctionnement de ces enzymes nécessite l'hydrolyse de deux molécules d'ATP. Chez les bactéries, les deux topoisomérases de type II sont : la gyrase et la topoisomérase IV.



**Figure 3.** Cassure d'un brin d'ADN par une attaque nucléophile d'un oxygène d'une tyrosine de l'enzyme sur un groupement phosphate du squelette de l'ADN (Wang, 2002).



**Figure 4.** Clivage double-brin d'un segment d'ADN par une topoisomérase II (Charvin, 2004).

### 2.2.2.1. Gyrase

La gyrase fut la première topoisomérase de type II à être identifiée (Gellert et *al.*, 1976). Sa découverte provoqua un grand intérêt, à cause de sa capacité unique à générer le super-enroulement négatif observé chez les bactéries. Cette enzyme est un hétérotétramère de type  $A_2B_2$ , dont les sous-unités sont codées par les gènes *gyrA* et *gyrB* (Reece & Maxwell, 1991). La gyrase est capable de relâcher le super-enroulement positif qui se produit lors de la progression de la fourche de réplication (vitesse 0.3 événement/minutes), alors qu'elle a beaucoup de mal à décaténer les molécules d'ADN en aval de la fourche de réplication (Hiasa & Marian, 1996). Sa capacité à sous-enrouler l'ADN est liée à un mécanisme particulier d'accrochage sur son substrat. Selon le modèle de Kampanis (Kampranis et *al.*, 1999), l'enzyme enroule l'ADN autour d'elle en formant une hélice (enroulée à droite) d'environ 140 pb. L'accrochage d'ATP qui entraîne la dimérisation des sous-unités portant l'activité ATPase, permet la capture du segment T, alors qu'une coupure est opérée dans le segment G. Ainsi, le passage de brin et l'inversion du croisement sont rendus possible.

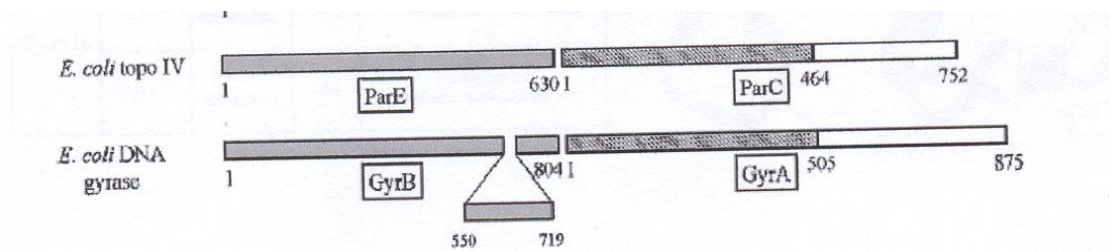
La forte courbure locale appliquée à l'ADN favorise la capture d'un segment T proche du segment G. En conséquence, la génération de sous-enroulement est facile, alors que la décaténation, qui met en jeu des segments G et T qui peuvent être distants, est défavorisée.

Le domaine responsable de l'association solénoïdale de l'enzyme sur l'ADN est la partie C-terminale (Reece & Maxwell, 1991). Sa délétion entraîne une incapacité de l'enzyme à sous-enrouler l'ADN. Par contre, elle devient alors excellente décaténase, par exemple capable de compléter les mutations dans la topo 4 (Kampranis et *al.*, 1996).

### 2.2.2.2. La topoisomérase IV

La topoisomérase IV est l'autre topoisomérase de type II présente dans les organismes procaryotes. C'est un hétérotétramère, comme la gyrase, composé de deux sous-unités codées par les gènes *parE* et *parC* qui sont homologues respectivement au *gyrB* et *gyrA* (Figure 5). Bien qu'elles partagent environ 40% d'homologie avec la gyrase, leur mécanisme et leurs fonctions cellulaires semblent être très différents (Hiasa & Marian, 1996 ; Ullsperger & Cozzarelli, 1996) : la topoisomérase IV semble être une bonne décaténase, comparé à la gyrase (70 fois plus d'activités que la gyrase). Elle serait donc impliquée d'avantage dans la séparation des brins nouvellement répliqués en aval de la fourche de réplication. Au contraire, la gyrase est plus efficace pour relaxer le super-enroulement positif généré lors de la progression de la fourche de réplication. En conséquence, le modèle généralement admis pour expliquer la séparation des chromosomes au cours du processus de réplication serait le suivant : au début de

la phase de réplication, lorsque la partie non-répliquée du chromosome est importante, la gyrase générerait du sous-enroulement en amont de la fourche de replication. En fin de la phase de réplication, par contre, lorsque la partie non-répliquée devient trop petite, la décaténation des brins nouvellement synthétisés par la topoisomérase IV serait le processus majoritaire de séparation. Des expériences récentes *in vivo* montre d'ailleurs que l'activité de la topoisomérase IV pourrait être localisée dans le temps vers la fin de la réplication (Espeli et *al.* 2003). Cependant, en l'absence de la gyrase, la topoisomérase IV est capable d'assurer seule le bon déroulement de la phase d'élongation *in vitro* (Hiasa et *al.*, 1994) et partiellement *in vivo* (Khodursky et *al.*, 2000). Pour ce faire, la topoisomérase IV doit être capable d'assurer en partie le rôle de relaxation du super-enroulement positif de la gyrase.



**Figure 5.** Comparaison des séquences des topoisomérases (Champoux, 2001).

### 3. Mécanisme d'action des fluoroquinolones

#### 3.1. Pénétration dans la bactérie

Les fluoroquinolones pénètrent très bien dans les bactéries Gram négatif, dont la membrane externe est riche en porines livrant le passage aux petites molécules hydrophiles.

#### 3.2. Action intracellulaire

Lorsqu'elles ont diffusé dans le cytoplasme, les quinolones vont inhiber de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes de la classe des topoisomérases : la gyrase (généralement cible principale chez les bactéries Gram négatif) et la topoisomérase IV (cible principale chez les bactéries Gram positif).

Les fluoroquinolones inhibent l'activité de l'enzyme en s'intercalant sous forme auto-assemblée dans la poche ménagée localement entre les brins d'ADN par l'action de l'enzyme et

en interagissant avec le complexe enzyme-ADN. Les sous-unités A forment des liens covalents via la tyrosine-122 (tyrosine-125 chez les *Campylobacter*) avec l'extrémité 5' de l'ADN. Le site de liaison des fluoroquinolones est localisé dans la bulle ménagée lors de l'ouverture locale de la molécule d'ADN.

Les interactions des quinolones avec les complexes ADN-gyrase ou ADN-topoisomérase IV aboutissent à des changements de conformation à la fois dans le complexe ADN-enzyme et dans l'enzyme elle-même. Ce qui aboutit rapidement à un arrêt de la réplication de l'ADN. Cet effet résulte probablement de la capacité du complexe quinolone-enzyme-ADN de bloquer la fourche de réplication (Hiasa & Marian, 1996).

L'enzyme liant l'ADN, en l'absence de quinolones (ni même une enzyme dépourvue d'activité de clivage) ne bloque pas la fourche de réplication. Ainsi, l'activité de clivage et la liaison des quinolones sont nécessaires pour bloquer la fourche de réplication de l'ADN. La vitesse d'inhibition de la réplication par ce mécanisme implique donc que les complexes ADN-gyrase et/ou ADN-topoisomérase IV soient distribués sur le chromosome à proximité de la fourche de réplication. Les théories actuelles admettent que les quinolones agissent en empêchant la réparation de l'ADN bactérien, ce qui entraîne la mort des cellules (Drlica & Zhao, 1997).

## **4. Mécanismes de résistance**

### **4.1. Résistance due à une altération dans les enzymes cibles**

#### **4.1.1. La gyrase**

Chez les bactéries Gram négatif, les mutations de la gyrase sont souvent observées chez les souches résistantes aux quinolones, mutations contribuant chez beaucoup d'espèces au phénotype de résistance en absence d'autres mutations. Les mutations les plus rapportées sont celles du *gyrA*, reflétant probablement le faible niveau de résistance conféré par les seules mutations du *gyrB*.

Chez *E. coli*, l'organisme le mieux étudié, les mutations liées à la résistance ont été décrites dans une région du gène *gyrA* appelée « *Quinolone-Resistance-Determining Region (QRDR)* », entre les codons 67 et 106, laquelle est proche de la tyrosine-122 qui se lie de façon covalente et passagère aux groupements phosphates de l'ADN pendant les réactions de passage des brins d'ADN par l'enzyme (Hopper, 1999). Deux acides aminés (la Serine-83 et Asp-87) sont souvent mutés dans la sous-unité A de l'enzyme chez les souches résistantes aux quinolones. La mutation sérine83-tryptophane entraîne une diminution de la fixation de la norfloxacine au complexe gyrase-ADN.



Chez les *Campylobacter* spp., les mutations du QRDR du gène *gyrA* impliquées dans la résistance aux quinolones ont été décrites entre le codon 70 et 109. Le mécanisme de résistance principal est lié à la mutation cytosine→thymine au codon 86 du gène *gyrA*, conduisant à la substitution threonine→isoleucine (homologue à la substitution Serine-83-tryptophane chez *E. coli*) dans la sous-unité A (protéine GyrA) de l'enzyme (Wang et al., 1993 ; Piddock et al., 2003).

Dans une structure cristalline d'un fragment de la protéine GyrA (Cabral et al., 1997), les acides aminés du QRDR étaient localisés dans une région chargée positivement le long de laquelle l'ADN se fixerait. Ainsi, le modèle actuel de résistance soutient que les mutations d'acides aminés dans le QRDR de GyrA altèrent la structure du site de liaison des quinolones proche de l'interface de l'enzyme et l'ADN. La résistance est alors causée par la diminution de l'affinité du complexe enzyme-ADN pour les quinolones.

#### **4.1.2. Topoisomérase IV**

La sous-unité *parC* de la topoisomérase IV est homologue au *gyrA*, et la sous-unité *parE* homologue au *gyrB*. Chez *E. coli*, les mutations dans la topoisomérase IV ne joueraient qu'un rôle secondaire dans la résistance aux quinolones. En effet, les mutations du *parC* ou *parE* ne contribuent à la résistance qu'en présence des mutations du *gyrA* (Hopper, 1999). Chez les *Campylobacter* spp., une seule étude a rapporté les mutations du *parC* liées à la résistance aux quinolones (Gibreel et al., 1998), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études (Bachoual et al., 2001 ; Piddock et al., 2003).

#### **4.1.3. Altération dans les enzymes cibles et résistance aux quinolones**

Les données directes sur les interactions des quinolones avec les topoisomérases proviennent des études de la gyrase de *E. coli* chez lequel il a été démontré que les quinolones se fixent plutôt au complexe gyrase-ADN que sur la gyrase seule (Shen et al., 1989). La mutation serine-83-tryptophane était aussi associée à une diminution de la fixation de la norfloxacine au complexe gyrase-ADN. Ainsi, la diminution de l'affinité des quinolones pour la cible enzyme-ADN peut provoquer la résistance de certains mutants, particulièrement ceux ayant des mutations dans et au voisinage du codon 83 (codon 86 pour *Campylobacter*) du QRDR. La structure cristallographique d'un fragment du GyrA d'*E. coli*, obtenue grâce aux rayons X, situe le QRDR dans une région chargée positivement le long de laquelle l'ADN se fixerait (Willmott & Maxwell, 1993). Cette région est adjacente aux deux tyrosines (Tyr122, une pour chaque unité GyrA de l'enzyme) qui sont liées à l'ADN pendant la coupure des brins

et est considérée comme un site candidat à la liaison des quinolones. Chez les *Campylobacter* spp., c'est la Tyr-125 qui est impliquée dans la coupure de brins d'ADN (Wang et al., 1993).

#### **4.1.4. Interactions des mutations de la résistance affectant deux cibles**

L'augmentation du niveau de résistance aux quinolones se traduit souvent par une série de mutations, d'abord dans l'enzyme cible principale, suivie par d'autres mutations dans la cible secondaire. Le niveau de résistance conférée par une mutation ponctuelle serait déterminé par au moins deux facteurs : l'étendue à laquelle la mutation altère la sensibilité de l'enzyme mutée, et le niveau de sensibilité de l'autre enzyme cible. Ainsi, après mutation de la cible principale, le plafond de la résistance est déterminé par le niveau de sensibilité de la cible secondaire. Cette succession de mutations de la résistance implique qu'une seule mutation spontanée peut causer une certaine élévation de la résistance quand il existe des différences chez une bactérie donnée dans la sensibilité des deux enzymes cibles à une quinolone particulière.

## **4.2. Résistance par réduction de la perméabilité**

L'enveloppe des bactéries Gram négatif constitue une barrière à la pénétration des antibiotiques (Nikaido, 1998). La première barrière contre la pénétration des antibiotiques dans la bactérie est la membrane externe. Chez certaines bactéries Gram négatif résistantes aux quinolones, des altérations étaient observées dans les protéines membranaires, lesquelles réduisaient la diffusion des porines (Hopper, 1999).

### **4.2.1. Les porines**

Chez les bactéries Gram négatif, les porines sont une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les  $\beta$ -lactamines et les fluoroquinolones. L'expression de ces protéines, ainsi que les interactions et les acides aminés qui organisent la diffusion dans le pore sont des éléments majeurs de la perméabilité membranaire. Des isolats cliniques de bactéries résistantes présentant des défauts de porines ou exprimant des porines modifiées ont été déjà décrits (Hopper, 1999). Des mutations induisant le rétrécissement du canal et l'altération du champ électrostatique, ont été rapportées dans la boucle L3 des porines.

Le diamètre et les propriétés électriques (charges) des pores sont importants dans la pénétration des antibiotiques. Les propriétés hydrophobes et électrostatiques des pores réduisent aussi l'accès à la cellule par la membrane externe. L'accès des molécules d'eau dans les pores confirme aussi que l'afflux des antibiotiques lipophiles ou amphiphiles se fait à des

taux faibles (Nikaido, 2001). Cependant, les antibiotiques amphiphiles et lipophiles peuvent contourner les pores par diffusion à travers les couches des phospholipides de la membrane externe, bien que ce processus soit ralenti par la couche des LPS à l'extrémité externe de la membrane externe (Nikaido & Vaara, 1985). Le nombre des pores actifs peut aussi déterminer l'accès de l'antibiotique.

#### **4.2.2. Les lipopolysaccharides (LPS)**

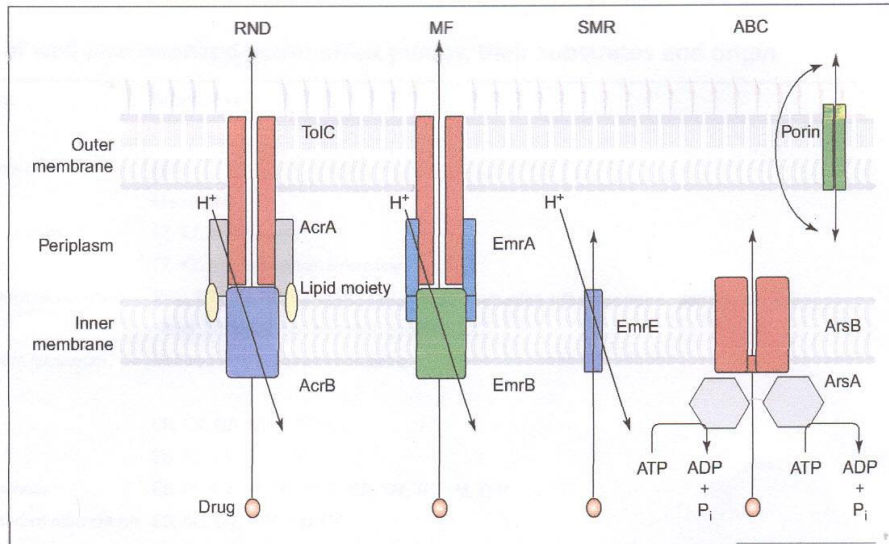
Les LPS constituent la couche lipidique la plus externe de la paroi des bactéries Gram négatif et sont localisés sur le feuillet externe de la membrane externe. Ce sont des complexes macromoléculaires hétérogènes comprenant une fraction polysaccharidique et une fraction lipidique (Kato et al., 1990). Chez les *Campylobacter* spp (Moran et al., 1991), les éléments communs aux LPS sont le D-glucose, D-galactose, L-glycero-D-manno-heptose, acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonique, acide D-glucuronique, D-galactosamine, et phosphoryléthanolamine. Le phosphate et l'acide N-acétylneuraminique sont aussi présents. Le lipide A contient du phosphate, D-glucosamine, 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose, éthanolamine phosphate, ester et amide de l'acide 3-hydroxytétradécanoïque, esters des acides hexadécanoïque et tétradécanoïque (Moran et al. 1991). La membrane externe, comportant des LPS en surface, constitue une barrière à plusieurs antibiotiques (Nikaido & Vaara, 1985). En effet, les LPS déterminent l'orientation et l'exposition des porines à la surface bactérienne. Selon leur taille, on distingue :

- LPS de structure complète (au-delà de 95 Kd) avec de très longues chaînes latérales
- LPS à longues chaînes latérales (entre 60 et 95 Kd)
- LPS de structure intermédiaire (entre 50 et 60 Kd) avec chaîne latérale est incomplète
- LPS de structure rudimentaire (en deçà de 50 Kd)

#### **4.2.3. Résistance par efflux actif**

Les pompes à efflux contribuent à la résistance intrinsèque et acquise des bactéries à une large gamme d'antibiotiques (Luo et al., 2003 ; Ge et al., 2005) (Figure 6). Ces pompes réduisent l'accumulation intracellulaire des antibiotiques et d'autres composés. Cette caractéristique est actuellement reconnue comme étant un mécanisme important de résistance chez les bactéries. L'analyse du génome de *C. jejuni* a révélé l'existence d'au moins 10 systèmes d'efflux (Parkhill et al., 2000). Cependant, seul l'efflux du système *cmeABC* (appartenant à la « RND *superfamily* ») est impliqué dans la résistance aux fluoroquinolones et à bien d'autres antibiotiques (Ge et al., 2005). Ce système *cmeABC* fonctionne comme un opéron à trois gènes

et contribue à la multirésistance chez les *Campylobacter* spp. Cet opéron comprend : un transporteur lié à la membrane interne (codé par le gène *cmeC*), une protéine périplasmique de fusion (codée par le gène *cmeB*) et un canal protéique lié à la membrane externe (codé par le gène *cmeA*).



**Figure 6.** Différents systèmes d'efflux chez *E. coli* (Keegan et al., 2002).

MF « *Major facilitator superfamily* ».

RND « *Resistance nodulation and cell division family* ».

SMR « *Small multidrug-resistance family* ».

MATE « *Multidrug and toxic compound extrusion family* ».

ABC « *ATP-binding cassette superfamily* ».

Les transporteurs dans ces différentes familles sont: AcrA, AcrB, TolC, EmrA, EmrB, EmrE, ArsA et ArsB.

« *Outer membran* » ou membrane externe.

« *Inner membran* » ou membrane interne.

### 4.3. Intégrons

Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes (Recchia & Hall, 1995). Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison spécifique de site médié par une

intégrase. Les intégrons sont donc susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques.

Incapables d'autoréplication, les intégrons sont obligatoirement portés par un réplicon (plasmide ou chromosome). Ils sont constitués d'une région 5' comprenant un gène *intI* qui code pour une intégrase, d'un site d'attachement *attI* et d'un promoteur.

Il existe plusieurs classes d'intégrons définis en fonction de la nature des gènes codant pour l'intégrase. Trois d'entre elles (classe 1, 2 et 3) ont été bien caractérisées et impliquées à ce jour dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Ce sont les intégrons de classe 1 qui sont impliqués dans la résistance aux quinolones chez les bactéries. Cependant, chez les *Campylobacter* spp., aucune étude n'a démontré l'implication des intégrons de classe 1 dans la résistance aux quinolones.

Chez la majorité des intégrons de classe 1, la région 3' contient trois cadres de lecture ouverts. Le premier, *qacEDI*, est un dérivé tronqué du gène *qacE* codant pour la résistance aux ammoniums quaternaires. Le second cadre de lecture est le gène *sulI* qui code pour la résistance aux sulfamides. Le troisième cadre de lecture désigné ORF5 ne code pour aucune fonction connue.

#### **4.4. Plasmides et gène *qnr***

Des plasmides porteurs de facteurs de résistance aux quinolones ont été récemment rapportés chez *E. coli* (Jeong et al., 2005). Le gène responsable de la résistance aux quinolones appelé *qnr*, est porté par un intégron de classe 1 et code pour une protéine de 218 acides aminés, laquelle est un pentapeptide répété (Tran & Jacoby, 2002 ; Jeong et al., 2005). Cette protéine protégerait la gyrase de l'action des quinolones. Ce mécanisme de résistance est très rare chez les bactéries. A ce jour, aucun « *qnr* » n'a été rapporté chez les *Campylobacter* spp. Une étude récente menée en Grèce a montré que le plasmide portant le gène *qnr* chez *E. coli* ne pouvait être transféré chez *C. jejuni* par transformation ou conjugaison à cause vraisemblablement de sa taille (180 Kb) (Chatzipanagiotou, 2005).

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

## Présentation du travail de thèse

Au Sénégal, il y a très peu de données sur l'épidémiologie des *Campylobacter*. Les seules données disponibles concernent la filière avicole, et indiquent que l'incidence des *Campylobacter* résistants aux fluoroquinolones atteint 40 % des souches isolées (Cardinale et al., 2003). Cette résistance des *Campylobacter* aux quinolones est en augmentation partout dans le monde (Engberg et al., 2001).

Les quinolones ont pour cible deux enzymes de la classe des topoisomérase : la gyrase (cible principale, portant deux sous-unités A et deux sous-unités B codée par les gènes *gyrA* et *gyrB* respectivement) et la topoisomérase IV (cible secondaire, codée par les gènes *parC* et *parE*).

Chez les *Campylobacter* spp., la résistance aux quinolones est liée à la présence de mutations dans une région de la protéine GyrA appelée « *Quinolone Resistance Determining Region (QRDR)* ». Le mécanisme de résistance prédominant aux quinolones est lié à la présence de la mutation thréonine→isoleucine à la position 86 du QRDR de la protéine GyrA. Mais cette mutation est associée à des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très variées des quinolones, suggérant que d'autres facteurs agiraient sur la CMI finale conférée par cette mutation.

Afin d'expliquer la variabilité des CMI observées pour une même mutation mais aussi les mécanismes de résistance des souches sans mutation, nous avons, dans un premier temps, recherché la présence d'autres mutations dans la partie C-terminale de la protéine GyrA, dans le *GyrB* et dans la topoisomérase IV ; et dans un deuxième temps, recherché la présence d'intégrons de classe 1, et enfin analysé la structure des lipopolysaccharides (LPS) des membranes bactériennes.

Par la suite, nous avons cherché à savoir si l'émergence de la résistance était liée à la diffusion d'un clone unique ou au contraire de plusieurs clones différents.

Ce travail est donc divisé en deux parties :

- les mécanismes de résistance aux quinolones
- l'émergence de la résistance et diversité des souches de *Campylobacter*.

Ce travail a déjà fait l'objet de 3 publications et d'un poster :

- **Kinana, A. D., E. Cardinale, F. Tall, I. Bahoun, J. M. Sire, B. Garin, S. Breurec, C. S. B. Boye, and J. D. Perrier-Gros-Claude.** 2006. Genetic Diversity and Quinolone Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry in Senegal. Appl. Environ. Microbiol. **72**:3309-3313.

- **Kinana, A.D., E. Cardinale, I. Bahsoun, F. Tall, , J.M. Sire, B. Garin, S. Breurec, C.S.B. Boye, and J.D. Perrier-Gros-Claude.** 2006. *Campylobacter coli*: diversity, genetic exchanges with *Campylobacter jejuni* and quinolone resistance. *In press*. Microbiological research (MICRES-D-06-00152).
  
- **Kinana, A.D., E. Cardinale, I. Bahsoun, F. Tall, , J.M. Sire, B. Garin, C.S.B. Boye, J.A Dromigny and J.D. Perrier-Gros-Claude.** 2006. Analysis of Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone-Resistant and Susceptible *Campylobacter jejuni* Strains Isolated in Senegal. *In press*. Int J. Antimicrob. Agents (IJAA-D-06-00157).
  
- Un poster présenté à la 44<sup>th</sup> « Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) », October 30<sup>th</sup> - November 2, 2004, Washington DC. Abstract C2-1719 (control number 2655) :  
**Kinana, A. D., E. Cardinale, F. Tall, C. S. B Boye and J. D. Perrier-Gros-Claude.** 2004. Mechanisms of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains isolated in Senegal.



## **ÉTUDE 1: Mécanismes de résistance aux quinolones**

## **INTRODUCTION**

Dans cette partie du travail, nous avons d'abord recherché la présence de mutations dans les topoisomérases II et IV, ensuite celle d'intégrons de classe 1, et enfin analysé la structure de lipopolysaccharides (LPS) des membranes bactériennes.

## **1. MATERIEL ET MÉTHODES**

### **1.1. Matériel**

#### **1.1.1. Souches bactériennes**

Les souches de *Campylobacter* analysées dans cette étude sont d'origine aviaire et avaient été isolées à partir d'échantillons de viande de poulets obtenus dans les fermes et points de vente de la région de Dakar et sa banlieue de 2000 à 2002. Au total, 95 souches de *Campylobacter* (54 souches de *Campylobacter jejuni* et 41 souches de *Campylobacter coli*) étaient incluses dans cette partie de notre travail.

#### **1.1.2. Milieux de culture**

- Gélose au sang (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) ;
- Mueller-Hinton avec 5% de sang de mouton (Becton Dickinson) ;
- Bouillon Brucella (Scharlau, Barcelone, Espagne) ;
- Gélose Karmali (Oxoid, Basingstoke, UK) ;
- Gélose Virion (Oxoid),
- Bouillon Preston (Oxoid).

#### **1.1.3. Réactifs pour la PCR**

- Tampon 10X (Promega, Madison, USA) ;
- dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) ;
- MgCl<sub>2</sub> (Promega), Amorces (Distribio, EVRY, France) ;
- Taq DNA polymérase (Promega),
- Molecular Water (Eurobio, Les Ulis, France).

#### **1.1.4. Antibiotiques**

- Bandelettes E-test® (AB Biodisk, Solna, Sweden) ;
- Disques de diffusion (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) ;
- Poudre d'acide nalidixique (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany),
- Poudre de ciprofloxacine (Bayer, Leverkusen, Germany).

### **1.1.5. Kits, milieux de suspension et divers**

- Kit de purification : QIAquick Gel Extraction Kit et QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany) ;
- api<sup>®</sup> Suspension Medium (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) ;
- api<sup>®</sup> NaCl 0.85% Medium (Biomérieux),
- GENbag et GENbox microaer (Biomérieux).

### **1.1.6. Réactifs d'électrophorèse horizontale**

- Tampon T.A.E 50X;
- Agarose (Sigma-Aldrich);
- Bromure d'éthidium (eurobio),
- Marqueur de poids moléculaire 100 pb (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England).

### **1.1.7. Réactifs d'extraction des lipopolysaccharides**

- TAE 50X ;
- Solution de lyse ;
- Mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25-24-1) pour l'extraction ;
- Solution d'acétate de sodium 3M à pH 5,2 ;
- Mélange Tris;
- Ethanol 70°C (Panreac, Barcelone, Espagne),
- Eau distillée stérile.

**NB** : voir annexe pour la préparation des solutions

### **1.1.8. Réactifs d'électrophorèse verticale (SDS-PAGE)**

- Solution d'acrylamide/bis 30% (Biorad, Hercules, USA) ;
- Tampon de résolution pH 8,8 (Tris-Hcl) ;
- Tampon de regroupement pH 6,8 (Tris-Hcl) ;
- Tampon de migration (Tris-glycine à pH 8,3) ;
- Tampon échantillon ;
- Ammonium persulfate (APS) 30%;
- TEMED (Sigma-Aldrich) ;
- Bleu Brilliant R (Sigma-Aldrich) ;
- Solution de décoloration (Biorad) ;
- Marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards, Biorad),

- Eau distillée stérile.

### **1.1.9. Autres matériels et consommables**

- Plaques de verre (8 x 11 cm) ;
- Espaceurs à insérer entre les plaques ;
- Cuve d'électrophorèse verticale (Biorad) ;
- Cuve d'électrophorèse horizontale ;
- Peignes ;
- Pipettes Pasteur ;
- Micropipettes (P10, P20, P200 et P1000),
- Cônes, tubes eppendorf.

### **1.1.10. Appareillage**

- Centrifugeuse (Sigma) ;
- Thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) ;
- Plaque chauffante ;
- Hotte,
- Etuve à 42°C.

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. Récolte des échantillons de poulet**

Les échantillons de viande de poulet étaient obtenus dans les fermes et point de vente de la région de Dakar et sa banlieue, entre Janvier 2000 et Décembre 2002. Au total, 40 fermes et 40 points de vente étaient sélectionnés pour cette étude. Pour chaque ferme, 5 poulets étaient achetés puis abattus, et les échantillons de chair et de peau (principalement au niveau du cou) prélevés. Les échantillons étaient rapidement mis dans des sacs en plastique stériles puis conservés dans une glacière. Au niveau de points de vente, 5 poulets étaient aussi achetés et les échantillons de chair et de peau prélevés.

### **1.2.2. Recherche et isolement des *Campylobacter***

- Une fois au laboratoire, les échantillons étaient sortis puis pesés. Environ 25g de chair et de peau étaient mis dans 225ml de bouillon Preston et incubés en atmosphère microaérophile (GENbag, Biomérieux) à 42°C pendant 24h ;

- Après cette étape d'enrichissement, 10µl de la suspension étaient ensemencés sur une gélose Virion et sur une gélose Karmali, utilisées comme milieux d'isolement ;
- Les géloses étaient ensuite incubées en atmosphère microaérophile à 42°C pendant 48h ;
- Les colonies de *Campylobacter* sont grises, humides et plates sur gélose Karmali ou grises à brunes sur gélose Virion. Au besoin, la morphologie et la mobilité étaient examinées à l'état frais au microscope à contraste de phase au grossissement X1000. Les *Campylobacter* sont des petits bacilles incurvés avec une mobilité « en vol de moucheron ».
- Repiquage sur gélose au sang, préalablement séchée 30 minutes sous hotte à flux laminaire de deux colonies caractéristiques présentes dans les boîtes d'isolement ;
- Incubation des géloses au sang à 42°C pendant 48h en atmosphère microaérophile ;
- Repiquage sur une nouvelle gélose au sang suffisamment humide d'une seule colonie caractéristique bien isolée ;
- La gélose au sang était incubée à 42°C pendant 48h en atmosphère microaérophile ;
- Après avoir vérifié l'absence de contaminations sur cette dernière boîte de gélose au sang, 2ml de bouillon peptoné glycérolé étaient ajoutés à la boîte ;
- La surface de la gélose était grattée avec une anse jetable (mise en suspension des colonies) ;
- 1,8ml de la suspension étaient récupérés et conservés dans un tube eppendorf,
- Les tubes étaient enfin conservés à -80°C.

### **1.2.3. Identification des souches par PCR multiplexe**

#### **1.2.3.1. Repiquage des souches**

- Sortir les tubes (contenant les souches bactériennes) du congélateur ;
- Prélever puis déposer à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 2 à 3 gouttes du bouillon glycérolé (contenant la souche bactérienne) à la surface d'une gélose au sang. L'ensemencement est réalisé à l'aide des stries serrées.

#### **1.2.3.2. Extraction d'ADN par ébullition**

- Après isolement des colonies sur de la gélose au sang, avec une anse de 5µl, récupérer l'équivalent d'une dizaine de colonies dans 200µl du tampon Tris-EDTA (TE) (pH 8) stérile ;
- Chauffer à 100°C pendant 5 minutes dans un bain-Marie. Centrifuger (5000xg pendant 2 minutes) ;

- Prélever 10µl du surnageant et diluer dans 90µl de TE. Ces échantillons peuvent être stockés à -20°C,
- 8µl de cette solution étaient utilisés pour la PCR.

### 1.2.3.3. PCR multiplexe

Les souches bactériennes étaient identifiées par PCR multiplexe en utilisant les amorces décrites par Denis et *al.*, (1999) (Tableau II). La PCR était réalisée dans un mélange final de 30 µl dont les concentrations des réactifs étaient : tampon 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,1 mM, amorces 0,425 µM et Taq polymérase 0,1 U/µl. Huit µl de solution d'ADN étaient utilisés pour la PCR.

#### Programme PCR

- . Denaturation initiale à 95°C pendant 5 min.
- . 35 cycles (dénaturation à 95°C pendant 30sec ; hybridation à 59°C pendant 1min 30sec ; élongation à 72°C, pendant 1min)
- . Elongation finale à 72°C pendant 10 min

**Tableau II.** Amorces de PCR pour l'identification des espèces.

Gène	Amorces	Amplification
<i>16S rRNA</i>	MD16S1 5'-ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC-3'	857 pb pour le genre <i>Campylobacter</i>
	MD16S2 5'-GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T-3'	
<i>mapA</i>	MDmapA1 5'-CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG-3'	589 pb pour l'espèce <i>C. jejuni</i>
	MDmapA2 5'-GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A-3'	
<i>ceuE</i>	COL3 5'-AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG-3'	462 pb pour l'espèce <i>C. coli</i>
	MDCOL2 5'-TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG-3'	

### 1. 2.3.4. Analyse des produits PCR

Les produits PCR étaient analysés après électrophorèse en gel d'agarose 1,5%.

Réalisation du gel d'agarose 1,5% dans du T.A.E 1X :

- Peser dans un bécher, 1,5g d'agarose ;
- Ajouter 100 ml de T.A.E 1X ;
- Chauffer jusqu'à ébullition ;
- Laisser refroidir puis ajouter du Bromure d'éthidium ;
- Couler le gel dans un moule, placer le peigne réalisant des puits ;

- Retirer le peigne une fois le gel polymérisé ;
- 10µl de produits PCR additionnés de 2µl de Bleu de charge 1X sont déposés dans chaque puits ;
- Déposer en parallèle 10µl de marqueur de poids moléculaire 100pb (Amersham) ;
- Electrophorèse horizontale classique dans du T.A.E 1X, 100V pendant 45 minutes,
- Visualisation directe sous U.V (dans une pièce noire).

#### **1.2.4. Sensibilité aux antibiotiques**

Deux antibiotiques ont été testés principalement : l'acide nalidixique et la ciprofloxacine. Trois méthodes avaient été utilisées pour tester la sensibilité des *Campylobacter* aux quinolones principalement : la méthode de diffusion des disques (pour la sensibilité aux antibiotiques), le E-test et la méthode de dilution en milieu gélosé pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

##### **1.2.4.1. Méthode de diffusion des disques**

###### **1.2.4.1.1. Préparation de l'inoculum**

Après repiquage des souches sur gélose au sang, quelques colonies bien isolées étaient émulsionnées dans une solution saline (api<sup>®</sup> NaCl 0.85% Medium, Bio Mérieux). La suspension bactérienne était ensuite ajustée à 0,5Mc Farland grâce à un appareil de mesure de densité optique (densimat Biomérieux) puis diluée au 1/10<sup>e</sup>.

###### **1.2.4.1.2. Ensemencement et application des disques de diffusion**

L'inoculum était coulé dans les boîtes de gélose au sang de façon à inonder toute la surface de la gélose pendant 30 secondes. Une fois la surface de la gélose séchée, les disques de diffusion contenant les antibiotiques étaient appliqués à la surface de la gélose. La lecture était faite après 24h d'incubation à 42°C en microaérobiose. Les diamètres critiques étaient ceux proposés par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, Edition 2004) et sont consignés dans le tableau III.

###### **1.2.4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode E-test<sup>®</sup>**

La CMI est la plus faible concentration d'un antibiotique donné capable d'interrompre, dans un milieu, toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée.

#### 1.2.4.2.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum était préparé comme décrit ci-dessus.

#### 1.2.4.2.2. Ensemencement et application des bandelettes

##### E-test®

Les géloses Mueller-Hinton (Becton Dickinson) additionnées de 5% de sang de mouton étaient ensemencées à l'aide d'un écouvillon imbibé de la suspension bactérienne. Dès que la surface de la gélose était sèche, deux bandelettes E-test® (AB Biodisk, Suède) d'acide nalidixique et de ciprofloxacine y étaient déposées. Ensuite, les boîtes étaient incubées en atmosphère microaéroophile à 42°C pendant 24h. La CMI était lue directement à l'intersection du bord d'inhibition et la bandelette Etest®. Les CMI critiques pour les deux antibiotiques sont consignées dans le tableau IV.

**Tableau III.** Phénotypes et diamètres critiques proposés pour la ciprofloxacine et l'acide nalidixique

Antibiotiques	Charge du disque	phénotype et diamètres critiques (mm)	
		S	R
Acide nalidixique	30µg	≥ 20	< 15
Ciprofloxacine	5µg	≥ 22	< 19

**Tableau IV.** Phénotypes et CMI critiques de la ciprofloxacine et de l'acide nalidixique

Antibiotiques	Gradient de concentration sur chaque bandelette E-test	Phénotypes et CMI critiques (µg/ml)	
		S	R
Acide nalidixique	0.016-256 µg/ml	≤ 8	> 16
Ciprofloxacine	0.002-32 µg/ml	≤ 1	≥ 4

S : sensible

R : résistant



### 1.2.4.3. Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu gélosé

#### 1.2.4.3.1. Culture des isolats sur gélose au sang

- Chaque isolat congelé était ensemencé sur une gélose Mueller-Hinton supplémentée à 5% en sang de mouton défibriné (MHSM) préalablement séchée sous hotte à flux laminaire pendant 30 minutes. Les géloses étaient incubées à 42°C pendant 48h en atmosphère microaéroophile.
- Une colonie caractéristique (1-2 mm, ronde, bombée, grisâtre ou jaunâtre, non hémolytique) (Fauchère, 1988) était repiquée sur une gélose MHSM humide afin d'obtenir un tapis bactérien. Cette gélose était incubée à 42°C pendant 48h en microaérophilie.

#### 1.2.4.3.2. Culture des souches en bouillon Brucella

Une strie du tapis bactérien était mise dans 4 ml de bouillon Brucella (Prolabo). Après homogénéisation, les suspensions bactériennes étaient incubées à 37°C pendant 24 h en atmosphère microaéroophile en laissant les tubes à demi-ouverts.

#### 1.2.4.3.3. Antibiotiques

Les gammes de concentrations des antibiotiques sont consignées dans le tableau V. Les CMI de l'acide nalidixique et de la ciprofloxacine étaient déterminées par dilution en milieu gélosé (Aarestrup et *al.*, 1997).

**Tableau V.** Gammes de concentrations des antibiotiques testés.

Antibiotiques	Fournisseur	Lot	Titre	Etendue de la gamme de raison 2
Acide nalidixique	SIGMA	48H0571	> 99 %	256µg/ml à 1 µg/ml
Ciprofloxacine	Bayer	G	99.3 %	32 µg/ml à 0.03 µg/ml

Préparation des solutions mères des antibiotiques (en fonction du titre de chaque lot) :

- 153,6 mg d'acide nalidixique étaient dissous dans 0,75 ml de soude à 20 % + 14,25 ml d'eau stérile pour obtenir une concentration de 10240 µg/ml.
- 19,2 mg de ciprofloxacine étaient dissous dans 0,75 ml de soude à 20 % + 14,25 ml d'eau pure stérile pour obtenir une concentration de 1280 µg/ml.

A partir de chaque solution mère, faire une série de dilutions formant une suite géométrique de raison 2 (de 5120 à 20 µg/ml pour l'acide nalidixique ; 640 à 0,6 µg/ml pour la ciprofloxacine).

Les solutions de cette série de dilution sont établies de façon à obtenir, après ajout de l'antibiotique dans la gélose MH au sang (voir ci-dessous), les concentrations de la gamme montrée dans le tableau V.

#### Préparation des géloses MH au sang et ajout de l'antibiotique :

- Aux 200 ml de gélose MH (Becton Dickinson) fondue et maintenue à 50°C, ajouter 11 ml de sang de mouton défibriné préalablement réchauffé à température ambiante ;
- Après homogénéisation, prélever 36 ml de cette gélose MH au sang ;
- Les couler dans une boîte de Pétri carrée de 120 mm ;
- Ajouter immédiatement 4 ml de solution d'antibiotique ;
- Mélanger par agitation ;
- Laisser sécher les boîtes de Pétri (couvercles ouverts) sous hotte à flux laminaire pendant 15 minutes,
- Conserver ensuite les boîtes à température ambiante jusqu'à ensemencement le jour même.

#### **1.2.4.3.4. Préparation des suspensions bactériennes et ensemencement (Aarestrup et *al.*, 1997)**

A partir du bouillon Brucella de 24 heures, chaque culture était ensuite ajustée à 0,5 unités de Mac Farland (soit environ  $10^8$  UFC/ml) à l'aide d'un appareil de mesure de densité optique (densimat bioMérieux, France), puis diluée au  $1/10^{\text{ème}}$  dans de l'eau ultra pure stérile afin d'obtenir environ  $10^7$  Unités Formant Colonies/ml (UFC/ml). Les dilutions étaient ensuite déposées dans une plaque stérile à 96 puits. Un  $\mu\text{l}$  de chacune de ces suspensions était ensemencé sur des géloses MHSM supplémentées en antibiotiques (soit environ  $10^4$  UFC/spot), à l'aide d'un multi-inoculateur automatique (multi-point Ellite, UK).

Pour chaque série de CMI, 4 souches de référence étaient aussi ensemencées en même temps que les souches à tester. Après ensemencement de chaque gamme d'antibiotique, des contrôles de fertilité (dépôt des suspensions bactériennes sur une gélose MHSM sans antibiotique) et de stérilité (gélose MHSM sans ensemencement de souches) étaient effectués. Les géloses étaient incubées à 37°C pendant 48 heures en atmosphère microaérophile.

#### **1.2.4.3.5. Lecture et critères d'interprétations**

Après 48 heures, la présence de colonies caractéristiques était recherchée. La CMI est la plus faible concentration pour laquelle aucune colonie n'est observée.

Selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2004 (CA-SFM), trois catégories cliniques sont retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (S), Intermédiaire (I), ou Résistant (R). Les valeurs critiques des antibiotiques retenus sont dans le tableau VI.

**Tableau VI.** CMI critiques des antibiotiques

Antibiotiques	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Acide nalidixique	CMI ≤ 8	8 < CMI ≤ 16	CMI > 16
Ciprofloxacine	CMI ≤ 1	1 < CMI ≤ 2	CMI > 2

#### 1.2.4.3.6. Contrôle qualité et validation des résultats

A chaque série de CMI, cinq souches de référence, *Escherichia coli* (CIP 7624), *Staphylococcus aureus* (CIP 7625), *Pseudomonas aeruginosa* (CIP 76110), *Enterococcus faecalis* (CIP 103214) et *C. jejuni* ATCC 33560 étaient traitées comme les souches de *Campylobacter*. Les CMI référencées pour ces souches de référence sont dans le tableau VII.

Les valeurs des CMI observées pour les souches de *Campylobacter* ne sont validées que si les valeurs de CMI des souches de référence, et les témoins de fertilité et de stérilité sont conformes aux résultats attendus.

**Tableau VII.** CMI référencées par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004) des souches de référence *E. coli* (CIP 7624), *S. aureus* (CIP 7625), *P. aeruginosa* (CIP 76110) et *E. faecalis* (CIP 103214).

Antibiotiques	CMI référencées par le N.C.C.L.S			
	<i>E. coli</i> (CIP 7624)	<i>S. aureus</i> (CIP 7625)	<i>P. aeruginosa</i> (CIP 76110)	<i>E. faecalis</i> (CIP103214)
Acide nalidixique	ND	ND	ND	ND
Ciprofloxacine	0,008-0,03	0,03-0,12	1-4	0,12-1

ND : non déterminé

NCCLS. (2004). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fourteenth informational supplement. M100-S14, vol. 24, n°1. National Committee for clinical laboratory standards, Wayne, Pa."

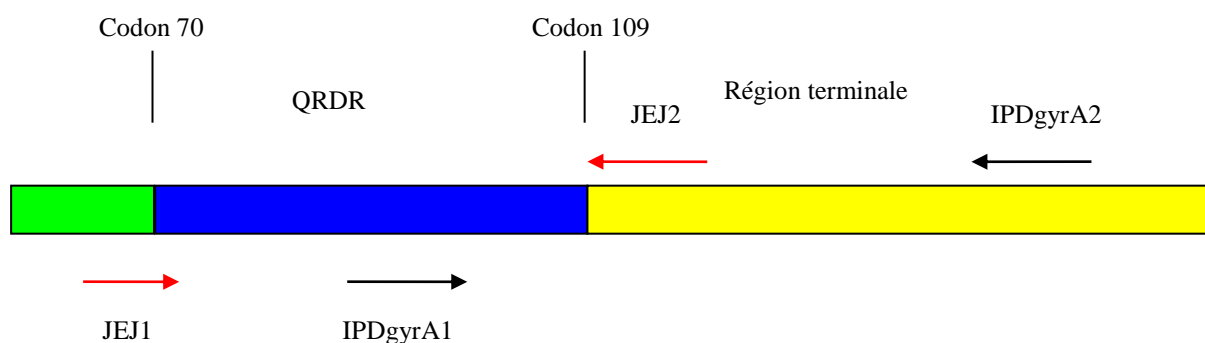
## 1.2.5. Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones

### 1.2.5.1. Recherche des mutations dans les topoisomérases

Nous savons que les mutations d'acides aminés dans une protéine donnée sont causées par des mutations des bases azotées au niveau de la séquence d'ADN codant pour cette protéine. C'est pour cela que nous avons séquencé les gènes codant pour les topoisomérases. Par la suite, grâce aux logiciels de traduction des séquences d'ADN en protéine, nous avons déterminé les séquences protéiques de nos souches (voir partie analyse des séquences pour les différents logiciels utilisés).

#### 1.2.5.1.1. Recherche des mutations dans le gène *gyrA*

Le QRDR du *gyrA* des souches de *Campylobacter* (codon 54-126 pour *C. jejuni* ; codon 51-152 pour *C. coli*) était amplifié par PCR en utilisant les amorces décrites par Wang et al. (1993) et Bachoual et al. (2001) respectivement (Figure 7).



**Figure 7.** Présentation schématique des régions amplifiées du gène *gyrA*.

#### 1.2.5.1.1.1. Extraction d'ADN

L'ADN chromosomique des souches a été extrait par ébullition suivant le protocole décrit par Bachoual et al. (2001) :

- Après isolement des colonies sur de la gélose au sang, prélever une dizaine de colonies puis les suspendre dans 200 µl d'eau stérile ;
- Chauffer à 100°C pendant 10 minutes ;
- Refroidir dans la glace pendant quelques minutes ;
- Centrifuger à 10.000 rpm pendant 2 minutes ;

- Prélever le surnageant (contenant l'ADN). Ces échantillons peuvent être stockés à -20°C ,
- 8µl de cette solution sont utilisés pour la PCR.

#### 1.2.5.1.1.2. Amplification par PCR de la région du gène *gyrA* appelée « *Quinolone Resistance Determining Region (QRDR)*»

Les différentes amorces utilisées pour amplifier le QRDR du gène *gyrA* sont indiquées dans le tableau VIII. Les conditions PCR étaient légèrement modifiées pour pouvoir obtenir une meilleure amplification: MgCl<sub>2</sub> à 2 mM, la température d'hybridation était ramenée à 50°C au lieu de 52°C.

**Tableau VIII.** Amorces utilisées pour amplifier les gènes des topoisomérases.

		Amorces – amplification du QRDR du <i>gyrA</i>	Amplification
<i>C. jejuni</i>	JEJ1	5'-GCT ATG CAA AAT GAT GAG GC -3'	220 pb
	JEJ2	5'-CAG TAT AAC GCA TCG CAG CG -3'	
<i>C. coli</i>	COL1	5'-ATA CTT TAT GCT ATG AAT GAT CTT -3'	306 pb
	COL2	5'-GTA GTT TGG AAC AAA ATC TAC CGT -3'	
Amorces pour l'amplification région C-terminale du GyrA			
<i>C. jejuni</i>	IPDgyrA1	5'-ACA GGA CAA GGC AAC TTT GG-3'	399 pb
	IPDgyrA2	5'- CCC TGT GCG ATA AGC TTC TAT-3'	
<i>C. coli</i>	IPDgyrA3	5'-TCC AAG TAT CGA TGG ACA AGG-3'	269 pb
	IPDgyrA4	5'-GCT CGT TAA GAC TAT GCG GAG-3'	
Amorces – amplification du QRDR du <i>gyrB</i>			
<i>C. jejuni</i>	P1	5'-TAA TGG CAG CTA GAG GAA GA -3'	358 pb
	P2	5'-ATG AGA TCC ATC AAC ATC CG -3'	
<i>C. coli</i>	GyrB1	5'-GCT AGA GGA AGA GAA GC -3'	359 pb
	GyrB2	5'-GCA TCT GTC ATG ATG ATG -3'	
Amorces – amplification du QRDR du <i>parC</i>			
<i>C. jejuni</i> et	P1	5'-TGG GAT CCA AAC CTG TTC AGC GCC GCA TT-3'	358 pb
<i>C. coli</i>	P2	5'-CGG AAT TCG TGG TGC CGT TAA GCA AA -3'	

Les conditions PCR pour le mélange réactionnel étaient les suivantes : tampon 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 0,6 mM, amorces 1 µM chacune, Taq polymérase 2,5 U et 8 µl d'ADN.

#### Programme PCR :

- Dénaturation initiale : 90°C, 5 minutes
- 30 cycles (Dénaturation à 90°C pendant 50 secondes ; hybridation à 50°C pendant 50 secondes ; élongation à 72°C pendant 30 secondes)
- Elongation finale : 72°C, 10 minutes

### 1.2.5.1.1.3. Amplification par PCR de la région C-terminale du gène *gyrA*

La partie C-terminale du gène *gyrA* (codons 107-239, codons 103-193, respectivement pour *C. jejuni* et *C. coli*) était amplifiée avec les amorces IPDgyrA1/IPDgyrA2 et IPDgyrA3/IPDgyrA4 que nous avons dessinées en utilisant le logiciel Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000), disponible à [http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html) (dernière visite, le 30 Mai 2006). Ces amorces sont décrites dans le tableau VIII.

Les conditions PCR (concentrations des réactifs dans le mélange réactionnel) étaient identiques à celles pour l'amplification du QRDR du *gyrA* (voir ci-dessus). Cependant, les températures d'hybridation étaient différentes. Le volume final du mélange réactionnel était de 50 µL.

#### Programme PCR pour *C. jejuni* :

- Dénaturation initiale : 95°C, 5 minutes
- 30 x (95°C, 50 secondes ; 56°C, 1 minute ; 72°C, 30 secondes)
- Elongation finale : 72°C, 10 minutes

#### Programme PCR pour *C. coli*:

- Dénaturation initiale : 95°C, 5 minutes
- 35 x (94°C, 50 secondes ; 50°C, 1 minute ; 72°C, 30 secondes)

Elongation finale : 72°C, 10 minutes

### 1.2.5.1.2. Recherche de mutations dans le « QRDR » du gène *gyrB*

Le QRDR du *gyrB* de *C. jejuni* (codon 371-540) était amplifié en utilisant les amorces décrites par Bachoual et *al.* (2001). Celui de *C. coli* était amplifié en utilisant les amorces GyrB1 et GyrB2 définies par Cooper et *al.* (2002), et correspondant respectivement aux positions 1123-1139 et 1481-1464 du gène *gyrB* de *C. jejuni* NCTC 11168 (Tableau VIII). Les conditions PCR étaient légèrement modifiées pour *C. jejuni* : température d'hybridation à 53°C. La PCR était réalisée dans un volume final de 50 µl.

Conditions PCR pour l'amplification du *gyrB* de *C. jejuni*: tampon 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 0,6 mM, amorces 1 µM chacune, Taq polymérase 5 U et 8 µl d'ADN.

#### Programme PCR *gyrB* *C. jejuni* :

- Dénaturation initiale : 95°C, 5 minutes

- 30 x (95°C, 50 secondes ; 50°C, 50 secondes ; 72°C, 30 secondes)

Elongation finale : 72°C, 10 minutes

Conditions PCR pour l'amplification du *gyrB* de *C. coli* : tampon 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 200 µM, amorces 0,4 µM chacune, Taq polymérase 5 U et 5 µl d'ADN.

Programme PCR *gyrB* *C. coli* :

- Dénaturation initiale : 94°C, 2 minutes
- 30 x (95°C, 1 minutes ; 48°C, 30 secondes ; 72°C, 45 secondes)

Elongation finale : 72°C, 5 minutes

#### **1.2.5.1.3. Recherche de mutations dans le QRDR du gène *parC***

Le gène *parC* était amplifié en utilisant les amorces et conditions décrites par Gibreel et *al.* (1998). La PCR était réalisée dans un mélange final de 25 µl. Les amorces pour l'amplification du *parC* sont décrites dans le tableau VIII.

Conditions PCR pour l'amplification du *parC* : tampon 1X, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP 400 µM, amorces 1µM chacune, Taq polymérase 2,5 U et 5 µl d'ADN.

Programme PCR *parC* :

- Dénaturation initiale : 94°C, 2 minutes
- 30 x (95°C, 1 minutes ; 48°C, 30 secondes ; 72°C, 45 secondes)

Elongation finale : 72°C, 5 minutes

#### **1.2.5.2. Recherche d'intégrons de classe 1**

Plusieurs couples d'amorces avaient été testés pour rechercher les intégrons de classe 1, lesquels sont généralement impliqués dans la résistance aux quinolones chez beaucoup de bactérie Gram négatif. Les amorces testées sont celles décrites par O'Halloran et *al.* (2004) ; Bissonnette & Roye (1992) (Tableau IX).

Pour le couple d'amorces F/R, les premières conditions testées étaient celles proposées par O'Halloran et *al.* (2004) : Tampon 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 0,2 mM, amorces 0,5 µM chacune, Taq polymérase 0,05 U/µl et de l'eau distillée stérile, le tout dans un volume final de 50 µl.

**Tableau IX.** Amorces utilisées pour détecter les intégrons de classe 1

Région amplifiée		Amorces testées
Int1	F	5'-GGC ATC CAA GCA GCA AGC-3'
	R	5'-AAG CAG ACT TGA CCT GAT-3'
	Int1F	5'-ACA TGT GAT GGC GAC GCA CGA-3'
	Int2R	5'-ATT TCT GTC CTG GCT GGC GA-3'
ORF	ORF6	5'-GTC GCT GCA ACT CGC GAC T-3'
	ORF4	5'-CAA ACT ATC AGG TCA AGT CTG CTT-3'
Sul	Sul1	5'-GTC CGA CAT CCA CGA CGT CTG ATC-3'
	Sul3	5'-CCT GGA GAT CTG CGA AGC GCA ATC-3'

Par la suite, différentes conditions PCR étaient testées pour ce premier couple d'amorces et pour les autres amorces afin d'obtenir une amplification: gammes de températures d'hybridation (50-60°C), gammes de concentration de MgCl<sub>2</sub> (1-4mM).

### 1.2.5.3. Analyse des produits issus de la PCR

Les produits issus de la PCR étaient analysés par électrophorèse horizontale classique comme décrit au paragraphe 1.2.3.4 .

#### 1.2.5.3.1. Purification des produits issus de la PCR

Les produits issus de la PCR étaient purifiés avec le kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) avant la réaction de séquence. Le protocole de purification est le suivant :

- Préparer un gel d'agarose de 1% ;
- Déposer 40 µl des produits PCR dans chaque puits du gel ;
- Migrer à 70 V pendant 1 heure ;
- Découper les bandes de DNA du gel sous UV ;
- Mettre les coupes dans des tubes eppendorf de 1,5ml ;
- Ajouter 500µl de tampon QG ;
- Incuber à 50°C pendant 10 minutes et observer la couleur des tubes qui doit être jaune ;
- Ajouter 500µl d'isopropanol ;
- Prélever 750µl du mélange, les mettre dans des tubes colonnes et centrifuger à 10.000rpm pendant 1 minute ;
- Répéter cette étape avec le reste du mélange ;
- Etape facultative : ajouter 500µl du tampon QG et centrifuger à 10.000rpm pendant 1 minute pour éliminer toute trace d'agarose ;
- laver avec 750µl de tampon PE (attendre 2 à 5 minutes avant de centrifuger) et centrifuger à 13.000 rpm pendant 1 minute ;



- Placer les colonnes dans des tubes eppendorf de 1,5ml ;
- Eluer avec 40µl de tampon EB, attendre 1 minute puis centrifuger à 10.000rpm pendant 1 minute,
- Conserver les échantillons de DNA à -20°C.

#### **1.2.5.3.2. Séquençage**

La réaction de séquence a été faite en France par la société Distribio. Cette société prête ses services pour tout ce qui est séquençage d'ADN et la synthèse des amorces de PCR. Les amorces pour la réaction de séquence étaient celles utilisées lors de l'amplification PCR. Tous les échantillons étaient séquencés dans les deux sens (direct et reverse) en utilisant le kit de séquence Big dye terminator V3.1 (Applied Biosystems) et un séquenceur multicapillaire Applied Biosystems 3100.

Une fois le séquençage terminé, les séquences nous étaient envoyées par e-mail sous forme de résultats bruts (chromatogrammes) et sous forme de séquence texte. Dès lors, l'analyse des séquences pouvait commencer.

#### **1.2.5.3.3. Analyse des séquences**

Les séquences corrigées d'ADN étaient sauvegardées sous forme de fichiers textes. Les séquences du *gyrA* et *gyrB* étaient comparées aux séquences de référence publiées (L04566, AF092101, AL139074 et AY330104). C'est le logiciel CLUSTALW (Thompson et *al.*, 1994) qui était utilisé pour toutes les comparaisons des séquences. Ce logiciel est disponible sur Internet à l'adresse <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw.html>.

Le logiciel Transeq était utilisé pour la traduction des séquences d'ADN en protéine. Il est disponible à l'adresse <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/transeq.html> (Dernière visite des sites Web, 30 Mai 2006).

#### **1.2.5.4. Analyse des composants membranaires : Lipopolysaccharides (LPS)**

Après extraction par la méthode de Kido et *al.* (1990), les LPS, composants de la membrane externe, étaient analysés par électrophorèse verticale en gel de polyacrylamide en présence du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE).

#### **1.2.5.4.1. Extraction des LPS**

- Après isolement des colonies de *Campylobacter* sur gélose au sang, prélever quelques colonies et les suspendre dans 1 ml d'eau stérile contenue dans un eppendorf ;
- Centrifuger pendant 10 minutes à 16.000 rpm. Eliminer le surnageant ;
- Suspendre le culot bactérien dans 100 µl de tampon T.A.E. Dissoudre le culot à l'aide d'un vortex pour avoir une solution homogène ;
- Ajouter 200 µl de solution de lyse (voir annexe). Chauffer le mélange à 60°C sur une plaque chauffante pendant 70 minutes ;
- Ajouter 1 ml du mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique. Centrifuger pendant 10 minutes à 16.000 rpm ;
- Recueillir le surnageant dans un 2<sup>ème</sup> tube eppendorf (éviter la couche blanchâtre de protéines à l'interface) ;
- Ajouter au surnageant 200 µl d'eau distillée stérile + 50 µl d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2. Vortexer ;
- Ajouter 2 volumes d'éthanol à 70°C. Mélanger par retournement puis laisser précipiter toute la nuit à -20°C. Centrifuger et éliminer le surnageant ;
- Resuspendre le précipité dans 200µl du mélange Tris-HCl 50 mM (pH 8) +acétate de sodium 100 mM. Vortexer ;
- Ajouter 2 volumes d'éthanol à 70°C puis mélanger par retournement. Relarguer les LPS à - 80°C pendant 20 minutes. Centrifuger et éliminer le surnageant ;
- Suspendre le culot final de LPS dans 50 µl d'eau distillée stérile,
- L'extrait de LPS peut être conservé à -80°C.

#### **1.2.5.4.2. Electrophorèse des LPS en gel de polyacrylamide en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE)**

Les LPS étaient séparés selon un mode discontinu en fonction de leur taille par la méthode SDS-PAGE. C'est une électrophorèse verticale sur minigels. La migration des produits se fait de bas en haut. Les LPS traversent (en présence du SDS) deux gels contigus : un gel de regroupement (pour le tassement de l'échantillon) et un gel de résolution.

##### **1.2.5.4.2.1. Montage du système d'électrophorèse**

- Nettoyer 4 plaques de verre (2 grandes + 2 petites) avec de l'éthanol à 70°C ;

- Intercaler deux espaceurs de même épaisseur entre la grande plaque et la petite de façon à former un moule ;
- Fixer l'ensemble sur l'assembleur en serrant délicatement les vis puis placer sur le support de montage,
- Vérifier l'étanchéité du montage en faisant couler de l'eau distillée.

#### **1.2.5.4.2.2. Préparation des gels**

##### **1.2.5.4.2.2.1. Gel de résolution à 12,5%**

Dans un tube Nunc de 50 ml, mélanger :

- 6 ml de tampon de résolution ;
- 8,3 ml d'acrylamide/bisacrylamide à 30% ;
- 5,7 ml d'eau distillée stérile ;
- 80 µl de Persulfate d'ammonium (APS) à 30% ;
- 20 µl de TEMED ;
- Couler immédiatement ce mélange dans le moule constitué par les plaques (bien s'assurer qu'il n'y a pas d'eau entre les plaques avant de couler le mélange) jusqu'à environ 1,5 cm du bord supérieur de la petite plaque ;
- Couvrir la partie supérieure du gel avec de l'eau distillée pour éviter la formation des bulles d'air,
- Laisser polymériser pendant 15 à 20 minutes.

##### **1.2.5.4.2.2.2. Gel de regroupement à 3%**

Dans un tube nunc de 45 ml, mélanger :

- 6,25 ml de tampon de regroupement ;
- 3,75 ml d'acrylamide/bisacrylamide à 30% ;
- 15 ml d'eau distillée stérile ;
- 75 µl de Persulfate d'ammonium à 30% ;
- 25 µl de TEMED ;
- Vider rapidement l'eau couvrant le 1<sup>er</sup> gel (gel de résolution) ;
- Couler immédiatement le mélange au dessus du gel de résolution jusqu'au bord supérieur de la petite plaque ;
- Insérer rapidement un peigne pour former des puits,
- Laisser polymériser.

#### **1.2.5.4.2.3. Préparation des échantillons**

Pendant que le gel se polymérise, mélanger dans un tube eppendorf de 1,5 ml :

- 20 µl de tampon échantillon (contenant du bétamercaptoéthanol),
- 20 µl d'extrait de LPS.

Vortexer le mélange puis le chauffer au bain-marie à 100°C pendant 2 à 3 minutes. Les tubes sont conservés à +4°C jusqu'au moment du dépôt des échantillons dans les puits du gel.

#### **1.2.5.4.2.4. Dépôt et migration des échantillons**

- Une fois le gel polymérisé, retirer le peigne ;
- Eliminer le tampon résiduel des puits à l'aide d'un papier buvard ;
- Sortir les échantillons du réfrigérateur ;
- Vortexer ;
- Transférer le gel sur le support d'électrophorèse ;
- Déposer 40 µl d'échantillon dans chaque puit ;
- Déposer 10 µl de standard en parallèle ;
- Introduire le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie au ¼ avec du tampon de migration ;
- Remplir la partie centrale de la cuve avec du tampon de migration de sorte qu'il soit en contact avec la partie supérieure du gel ;
- Refermer la cuve et la connecter au générateur de tension ;
- Migrer les échantillons à 40 mA pendant 1h 30 minutes ;
- Arrêter la migration,
- Sortir les plaques de la cuve et décoller délicatement le gel pour la détection des LPS.

#### **1.2.5.4.2.5. Détection des bandes de LPS par coloration au bleu brillant**

Les bandes de LPS étaient détectées après coloration au bleu Brillant.

##### **1.2.5.4.2.5.1. Coloration au bleu brillant**

- Mettre le gel dans la solution de coloration ;
- Laisser le gel se colorer sous agitation lente pendant une nuit,
- Eliminer la solution de coloration.

#### **1.2.5.4.2.5.2. Décoloration**

- Remplacer la solution de coloration par une solution de décoloration (Biorad) ;
- Faire une première décoloration du gel sous agitation lente pendant 15 minutes ;
- Eliminer la solution de décoloration ;
- Faire une deuxième décoloration pendant 15 minutes avec une nouvelle solution ;
- Eliminer la solution de décoloration ;
- Faire une troisième décoloration sous agitation lente pendant toute une nuit ;
- Eliminer la solution de décoloration et la remplacer par de l'eau distillée stérile,
- Les bandes de LPS peuvent être visibles.

#### **1.2.5.4.2.5. 3. Séchage du gel**

Les gels de polyacrylamide peuvent être séchés à 65°C pour leur conservation et surtout pour faciliter l'interprétation des profils.

- Transférer le gel sur du papier Wattman ;
- Recouvrir le gel avec du Saran ;
- Déposer l'ensemble sur le dispositif de chauffage connecté à une pompe à vide ;
- Régler le dispositif de chauffage à 65°C et commencer à chauffer ;
- Démarrer la pompe et laisser fonctionner pendant environ 4 h ;
- une fois le gel séché, ramener le système de chauffage à la température ambiante ;
- Ouvrir délicatement le couvercle du système de chauffage afin de couper le vide ;
- Arrêter la pompe à vide,
- Le gel séché et fixé sur le papier Wattman peut être photographié, scanné et conservé.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Phénotypes de résistance et CMI

Des 54 souches de *C. jejuni* analysées, 27 étaient résistantes à la ciprofloxacine et à l'acide nalidixique, 3 étaient sensibles à la ciprofloxacine mais de sensibilité intermédiaire à l'acide nalidixique et 24 étaient sensibles aux deux antibiotiques (Tableau X). Parmi les 41 souches de *C. coli*, 16 étaient résistantes aux deux antibiotiques, 1 était résistante à la ciprofloxacine mais intermédiaire à l'acide nalidixique et 24 étaient sensibles aux deux antibiotiques (Tableau XI). Les CMI de la ciprofloxacine et de l'acide nalidixique pour les souches étudiées sont indiquées dans les tableaux X et XI.

**Tableau X.** CMI et phénotypes de résistance des souches de *C. jejuni*

Nombre de souches de <i>C. jejuni</i>	Phénotypes		CMI (µg/ml)	
	Ciprofloxacine	Acide nalidix.	Ciprofloxacine	Acide nalidix.
24	S	S	0,062-1	0,125-2
3	S	I	0,125	16
27	R	R	8- >32	32- >256

**Tableau XI.** CMI et phénotypes de résistance des souches de *C. coli*

Nombre de souches de <i>C. coli</i>	Phénotypes		CMI (µg/ml)	
	Ciprofloxacine	Acide nalidix.	Ciprofloxacine	Acide nalidix.
24	S	S	0,062-1	0,125-2
1	R	I	>32	16
16	R	R	8- >32	32- >256

S : sensible  
R : résistant  
I : intermédiaire

## 2.2. Mutations du QRDR de GyrA

A l'issue de la PCR, les amplicons de 220 pb et 306 pb ont été obtenus respectivement chez *C. jejuni* et *C. coli* (figure 8).



**Figure 8.** Amplicons obtenus à l'issue de l'amplification par PCR des gènes *gyrA* de *C. jejuni* et *C. coli*.

Des 27 souches de *C. jejuni* hautement résistantes à la ciprofloxacine (CMI de 8 à >32 µg/ml) et à l'acide nalidixique (CMI de 32 à >256 µg/ml), 18 avaient la mutation thréonine-86-isoleucine, 4 avaient la mutation thréonine-86-alanine, et 5 n'avaient aucune mutation dans le QRDR de la protéine GyrA (Tableau XII). Cependant, 3 souches sensibles à la ciprofloxacine (CMI 0,125 µg/ml) mais intermédiaires à l'acide nalidixique (CMI 16 µg/ml) avaient aussi la mutation thréonine-86-alanine dans la protéine GyrA. Les 24 souches de *C. jejuni* sensibles aux deux antibiotiques n'avaient que des mutations silencieuses (n'entraînant pas de changement d'acide aminé) localisées au niveau de l'histidine-81 (CAC→CAT) et de la sérine-119 (AGT→AGC), et dans certains cas au niveau de la glycine-110 (GGC→GGT).

Des 16 souches de *C. coli* résistantes aux deux antibiotiques, 14 avaient la mutation thréonine-86-isoleucine et 2 n'avaient aucune mutation de GyrA (Tableau XIII). Aucune mutation de GyrA n'avait été détectée dans une souche de *C. coli* ayant un phénotype dissocié (CMI >32 µg/ml pour la ciprofloxacine, CMI 8 µg/ml pour l'acide nalidixique). Les 25 souches sensibles à la ciprofloxacine et à l'acide nalidixique n'avaient qu'une mutation silencieuse localisée au niveau de la phenylalanine-99 (TTT→TTC).

Les Figures 9 et 10 montrent les résultats de la comparaison des séquences d'ADN et de protéines respectivement.

**Tableau XII.** CMI et mutations de GyrA chez *C. jejuni*

Phénotype			Gamme de CMI (µg/ml)		codons et acides aminés correspondant du QRDR du <i>gyrA</i> de <i>C. jejuni</i>							
Cip	Nal	nbre	Cip	Nal	codon	ac. aminé	codon	ac. aminé	codon	ac. aminé	codon	ac. aminé
S	S	23	0.062-0.5	1-2	CAC	His-81	ACA	Thr-86	GGC	Gly-110	AGT	Ser-119
S	S	1	1	0.125	-- T	-	---	-	---	-	-- C	-
S	S	1	1	0.125	-- T	-	---	-	-- T	-	-- C	-
S	I	3	0.125	16	-- T	-	G--	Ala-86	-- T	-	-- C	-
R	R	15	32->32	64->256	-- T	-	- T-	Ile-86	---	-	-- C	-
R	R	3	16->32	>256	-- T	-	- T-	Ile-86	-- T	-	-- C	-
R	R	4	8->32	32-128	-- T	-	G--	Ala-86	-- T	-	-- C	-
R	R	5	8->32	64->256	-- T	-	---	-	---	-	-- C	-

**Tableau XIII.** CMIs et mutations de GyrA chez *C. coli*

Phénotypes			Gamme des CMIs		Codons et acides aminés correspondant du <i>gyrA</i> de <i>C. coli</i>			
Cip	Nal	nbre	Cip	Nal	Codon	acide aminé	Codon	acide aminé
S	S	24	0,062-0,5	1-2	ACT	Thr-86	TTT	Phe-99
R	R	14	8- >32	32- >256	- T-	Ile	-- C	-
R	R	2	8- >32	64- 128	---	-	-- C	-
R	I	1	>32	16	---	-	-- C	-

Cip : ciprofloxacine  
Nal : acide nalidixique



```

L04566      TTATATGCTATGCAAAATGATGAGGCCAAAAAGTAGAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGT
110B      -----GAACAGATTTTGTCAAATCAGCCCGT
                                     *****
                                     81      86
L04566      ATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATGCT
110B      ATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCATCCACATGGAGATATAGCAGTTTATGATGCT
                                     *****
                                     119
L04566      TTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGCAAC
110B      TTGGTTAGAATGGCTCAAGATTTTTTCTATGAGATATCCAAGTATTACAGGACAAGGTAAC
                                     *****
                                     119
L04566      TTTGGATCTATAGATGGTGATAGTCCCGCTGCGATGCGTTATACTGAAGCAAA
110B      TTTGGATCTATAGATGGTGATAGCGCCGCTGCGATGCGTTATACTG-----
                                     *****

```

**Figure 9.** Comparaison des séquences d'ADN du gène *gyrA* de *C. jejuni* isolé au Sénégal et de la séquence de référence L04566\*.

Mutation thréonine-isoleucine au codon 86

```

                                     81      86
                                     ↓
L04566      LYAMQNDEAKSRTDFVKSARIVGAVIGRYHPHGDTAVYDALVRMAQDFSMRYPSITGQGN
110B      -----TDFVKSARIVGAVIGRYHPHGDIAVYDALVRMAQDFSMRYPSITGQGN
                                     *****
                                     119
L04566      FGSIDGDSAAAMRYTEA
110B      FGSIDGDSAAAMRYT--
                                     *****

```

**Figure 10.** Comparaison des séquences protéiques correspondantes (*C. jejuni* isolé au Sénégal et de la séquence de référence L04566).

\* La séquence L04566 a été publiée par Wang et al. (1993), et a été identifiée chez une souche sauvage sensible. Cette séquence est exactement identique à la séquence du gène *gyrA* de la souche de référence *C. jejuni* NCTC 11168 publiée par Parkhill et al. (2000). La séquence L04566 a été utilisée comme référence par plusieurs auteurs (Bachoual et al., 2001 ; Hakanen et al. 2002 ; Piddock et al. 2003).

### 2.3. Mutations des gènes *gyrB*, *parC* et hors QRDR du gène *gyrA*

Afin de vérifier le rôle des mutations du *gyrB*, *parC* et de la région C-terminale de GyrA (en aval du site actif des gyrases) dans la résistance aux quinolones, nous avons séquencé les 7 souches (5 *C. jejuni* et 2 *C. coli*) résistantes aux quinolones mais sans mutations dans le QRDR de GyrA, les 7 souches ayant la mutation thréonine-86-alanine dans le QRDR de GyrA, 5 souches (3 *C. jejuni* et 2 *C. coli*) choisies au hasard parmi les souches résistantes ayant la mutation thréonine-86-isoleucine et 5 autres souches (3 *C. jejuni* et 2 *C. coli*) choisies au hasard parmi les souches sensibles aux quinolones. Dans la région C-terminale du QRDR de GyrA analysée, les 18 souches de *C. jejuni* particulièrement avaient la mutation asparagine-203-serine, et 2 souches de *C. jejuni* avaient une mutation additionnelle (alanine-206-thréonine) (Tableau XIV). Le QRDR du gène *gyrB* des souches était séquencé puis analysé mais n'avait montré que des mutations silencieuses : Arg-389 (CGC→CGT), Leu-403 (TTA→TTG), Phe-436 (TTC→TTT), Leu-454 (CTA→TTA) et Ala-469 (GCT→GCC). Malgré des efforts prolongés et répétés, nous n'avons pas pu amplifier le QRDR du gène *parC* en utilisant les amorces et les conditions décrites par Gibreel et *al.* (1998).

**Tableau XIV.** Mutations dans et hors QRDR de GyrA

Souches	Mutations dans la protéine GyrA		CMI (µg/ml)	
			Cip	Nal
V34A	aucune	Asn-203-Ser	0,125	2
55A	aucune	Asn-203-Ser	0,125	2
90B	aucune	Asn-203-Ser, Ala-206-Thr	0,5	8
76A	Thr-86-Ala	Asn-203-Ser	0,125	16
76B	Thr-86-Ala	Asn-203-Ser	0,125	16
76C	Thr-86-Ala	Asn-203-Ser	0,125	16
112A	Thr-86-Ile	Asn-203-Ser	>32	>256
48A	Thr-86-Ile	Asn-203-Ser	>32	128
118C	Thr-86-Ile	Asn-203-Ser	16	>256
101B	Thr-86-Ile	aucune	>32	64
F32	Thr-86-Ile	aucune	>32	>256
78A	Thr-86-Ala	Asn-203-Ser	>32	32
78C	Thr-86-Ala	Asn-203-Ser	>32	128
78B	Thr-86-Ala	Asn-203-Ser	>32	128
F18	Thr-86-Ala	Asn-203-Ser, Ala-206-Thr	8	128
84C	aucune	Asn-203-Ser	>32	>256
108A	aucune	Asn-203-Ser	>32	>256
115C	aucune	Asn-203-Ser	>32	>256
89C	aucune	Asn-203-Ser	>32	>256
95A	aucune	Asn-203-Ser, Ala-206-Thr	8	128
106C	aucune	aucune	16	128
60C	aucune	aucune	>32	128
52B	aucune	aucune	0,062	2
42A	aucune	aucune	0,125	2

#### **2.4. Recherche d'intégrons de classe 1**

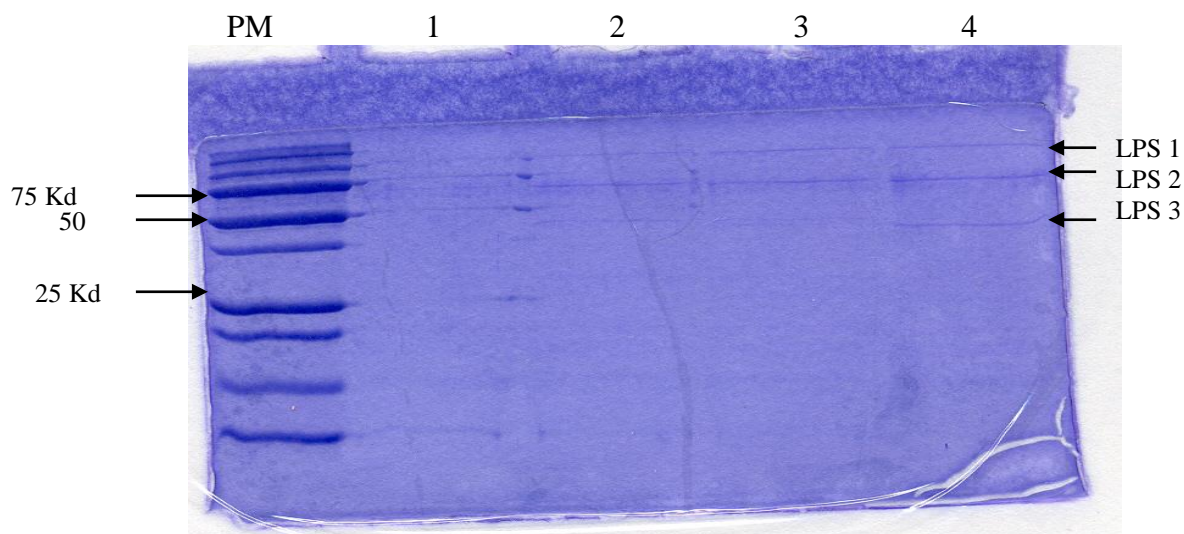
Aucun intégron de classe 1 n'a été détecté chez les 7 souches résistantes aux quinolones mais sans mutation dans le QRDR du GyrA, malgré l'utilisation de couples d'amorces variées.

#### **2.5. Composant membranaires : les lipopolysaccharides (LPS)**

Trois profils différents de LPS étaient identifiés chez les 7 souches résistantes sans mutations de GyrA (Tableau XV). Ces profils étaient constitués chacun de 3 LPS (Figure 11) :

- 1 LPS complet à très longues chaînes latérales et de taille comprise entre 100 et 150 KD,
- 1 deuxième LPS à longues chaînes latérales de 75 KD ou de taille comprise entre 50-75 KD (selon les souches) ;
- 1 troisième LPS de structure intermédiaire (50 KD) ou de structure rudimentaire de taille comprise entre 37-50 KD.

Toutes les 7 souches analysées avaient en commun 1 LPS complet à très longues chaînes latérales (100-150 KD). Seule la souche de référence *C. jejuni* ATCC 33560 (souche sensible utilisée comme témoin) avait un LPS à 37 KD. C'est un LPS de structure rudimentaire.



**Figure 11.** Electrophorèse verticale des LPS sur gel de polyacrylamide en présence du SDS  
 PM : Poids moléculaire (Precision Plus Protein Standards)  
 1 à 4 : profils de 4 souches testées

**Tableau XV.** Profils des LPS (en Kilodalton) observés dans les souches de *Campylobacter* sans mutation dans le QRDR de GyrA.

Souche	126C	108A	84C	89C	115C	95A	60C	112A	<i>C.jejuni</i> ATCC 33560
LPS 1	100-150	100-150	100-150	100-150	100-150	100-150	100-150	100-150	100-150
LPS 2	75	75	75	50-75	50-75	50-75	50-75	50-75	50-75
LPS 3	50	37-50	37-50	37-50	37-50	37-50	37-50	37-50	37

112A : souche résistante portant la mutation thréonine-86-isoleucine et utilisée comme témoin.  
*C. jejuni* ATCC 3350 : souche sensible utilisée comme témoin.

### 3. DISCUSSION

Les antibiotiques sont massivement utilisés dans l'élevage non seulement pour lutter contre les infections bactériennes mais aussi comme promoteurs de croissance, avec comme conséquence, un développement de bactéries résistantes aux antibiotiques utilisés.

Dans ce travail, nous avons exploré les mécanismes de résistance aux quinolones des souches de *Campylobacter jejuni* et *C. coli* isolées du poulet au Sénégal. Nous avons d'abord recherché les mutations dans les topoisomérases, cibles principales des quinolones. Comme rapporté antérieurement (Bachoual et al., 2001 ; Piddock et al., 2003), la mutation thréonine-86-isoleucine dans la sous-unité A (protéine GyrA) de l'enzyme ADN gyrase était la principale mutation associée à un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez *Campylobacter*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très variées (CMI de 8 à > 32µg/ml pour la ciprofloxacine, CMI de 32 à > 256µg/ml pour l'acide nalidixique).

L'autre mutation identifiée (uniquement chez les souches de *C. jejuni*) était la thréonine-86-alanine. Cette mutation avait été rapportée pour la première fois chez une souche clinique de *C. jejuni* résistante à l'acide nalidixique (CMI 64 µg/ml) mais avec une CMI de la ciprofloxacine relativement basse (CMI 2 µg/ml) (Bachoual et al., 2001). Récemment, la même mutation a été identifiée chez des souches de *C. jejuni* isolées du poulet, avec des CMI élevées pour l'acide nalidixique (CMI >32 µg/ml) mais sensibles à la ciprofloxacine (Dionisi et al., 2004 ; Griggs et al., 2005). Cependant, dans notre étude, la mutation thréonine-86-alanine était aussi observée chez 3 souches de *C. jejuni* intermédiaires à l'acide nalidixique (CMI 16 µg/ml) mais sensibles à la ciprofloxacine. Les CMI de l'acide nalidixique pour ces 3 souches étaient huit fois plus élevées comparé aux CMI modales observées chez les souches sensibles du Sénégal. Ainsi, la mutation thréonine-86-alanine ne semblerait avoir pour conséquence qu'une élévation plus ou moins marquée de la CMI de l'acide nalidixique sans que la CMI de la ciprofloxacine ne soit obligatoirement affectée.

Afin d'expliquer la variabilité des CMI observées pour une même mutation, il avait été suggéré, en comparaison aux entérobactéries, que des mutations dans les gènes *gyrB*, *parC* ou hors QRDR du GyrA peuvent moduler la CMI finale conférée par les mutations situées à l'intérieur du QRDR du GyrA chez *Campylobacter*. En effet, les souches de *C. jejuni* ou *C. coli* ayant une même mutation (thréonine-86-isoleucine ou thréonine-86-alanine) avaient des CMI très variées (CMI de 8 à >32µg/ml pour la ciprofloxacine, CMI de 32 à >256µg/ml pour l'acide nalidixique). D'un autre côté, 7 souches résistantes aux quinolones n'avaient aucune mutation dans le QRDR du GyrA. Pour expliquer, d'une part la variation de CMI observées pour une même mutation, et d'autre part les mécanismes de résistance des souches sans

mutation, nous avons séquencé le QRDR du *gyrB* des 19 souches de *C. jejuni* et *C. coli* décrites ci haut (celles présentant des CMI's variées et celles sans mutation dans le QRDR du GyrA). L'analyse des séquences d'ADN n'a révélé que la présence des mutations silencieuses (n'entraînant pas de changement d'acide aminé dans la protéine correspondante). De plus, en utilisant les amorces et les conditions PCR décrites par Gibreel et al. (1998), nous n'avons pas pu amplifier le gène *parC* comme d'autres auteurs l'ont d'ailleurs rapporté (Bachoual et al., 2001 ; Piddock et al., 2003). Même en changeant les conditions PCR c'est-à-dire en faisant une gamme de températures d'hybridation (53°-63°C) et une gamme de concentrations de MgCl<sub>2</sub> (1-4mM), aucune amplification du *parC* n'avait pu être obtenue. Ces résultats en accord avec ceux rapportés antérieurement (Bachoual et al., 2001 ; Griggs et al., 2005), confirment que le gène *gyrB* n'est pas impliqué dans la résistance aux quinolones chez *Campylobacter*, et que le gène *parC* semble être absent chez *Campylobacter*. En effet, la recherche dans le génome complet publié de la souche *C. jejuni* NCTC 11168 n'a montré aucun gène homologue au *parC*. Aussi, les gènes codons pour les topoisomérases IV sont absents des génomes publiés d'un certain nombre de bactéries (*Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Helicobacter pylori*). C'est la gyrase qui vraisemblablement assume la fonction des topoisomérases IV dans ces organismes. Il est donc probable que les *Campylobacter* aussi manquent de topoisomérases IV.

D'un autre côté, nous avons aussi séquencé la région C-terminale du gène *gyrA* (codon 107-239) des souches résistantes présentant des CMI's très variées, et celles des souches sans mutations dans le QRDR du GyrA, identifiant les mutations asparagine-203-sérine et alanine-206-thréonine aussi bien chez les souches (*C. jejuni*) sensibles que résistantes. Ces résultats en phase avec une étude antérieure (Dionisi et al., 2004), suggèrent que ces mutations ne sont pas impliquées dans la résistance aux fluoroquinolones.

D'autres facteurs tels que les pompes à efflux, les intégrons de classe 1 et la perméabilité membranaire peuvent contribuer à la résistance aux quinolones. Le rôle des pompes à efflux dans la résistance aux quinolones a été démontré chez *Campylobacter* (Ge et al., 2005 ; Luo et al., 2003). D'une manière générale, les souches utilisant un système d'efflux présentent un phénotype de multirésistance (résistantes aux antibiotiques de classes très variées) (Ge et al., 2005). Dans notre étude, nous n'avons pas exploré la présence d'efflux puisque les 7 souches résistantes aux fluoroquinolones mais sans mutation dans le QRDR du GyrA étaient sensibles aux autres antibiotiques testés (bétalactamines, érythromycine, tétracycline).

Aucun intégron de classe 1 n'a été détecté dans les souches sans mutation, ceci malgré la large gamme des couples d'amorces utilisées.

L'analyse des lipopolysaccharides (LPS) a révélé chez chacune des souches sans mutation la présence de 3 LPS avec des profils variés. Toutes les 7 souches analysées avaient en commun 1 LPS complet à très longues chaînes latérales et de haut poids moléculaire (100-150 Kd). La différence entre ces souches résistantes et la souche *C. jejuni* ATCC33560 (souche sensible utilisée comme témoin) se situait au niveau du 3<sup>ème</sup> LPS dont le poids moléculaire était compris entre 37 et 50 Kd (ou exactement 50 Kd) pour les souches résistantes, et exactement 37 Kd pour la souche témoin. Le LPS de poids moléculaire 37 Kd est un LPS de structure rudimentaire. Les LPS, composants membranaires localisés sur le feuillet externe de la membrane externe des bactéries Gram négatif, peuvent freiner la diffusion des antibiotiques au travers des couches des phospholipides de la membrane externe (Nikaido & Vaara, 1985). Ils déterminent aussi l'orientation et l'exposition des porines à la surface bactérienne. Donc, la présence des LPS de structure relativement évoluée ou intermédiaire (comparés à ceux de structure rudimentaire) dans les souches résistantes sans mutation dans le QRDR du GyrA, pourrait peut-être expliquer la résistance aux quinolones de ces souches. Cependant, il est aussi connu que *Campylobacter* est intrinsèquement moins sensible aux quinolones que ne l'est *Escherichia coli* à cause de la différence de structure au niveau des gyrases (Wang et al., 1993). En effet, *C. jejuni* et *E. coli* partagent approximativement 49% d'identité au niveau de la protéine GyrA de l'enzyme ADN gyrase.

#### 4. CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons exploré les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones des souches de *Campylobacter jejuni* et *C. coli* isolées du poulet au Sénégal. La mutation thréonine → isoleucine à la position 86 dans la région de la protéine GyrA appelée « *Quinolone Resistance Determining Region* (QRDR) » est le mécanisme de résistance prédominant des souches isolées au Sénégal. Cependant, certaines souches hautement résistantes aux fluoroquinolones avaient plutôt la mutation thréonine → alanine à la position 86 de la protéine GyrA alors que d'autres n'avaient aucune mutation dans le QRDR de GyrA. Cette mutation thréonine-86-alanine a été aussi détectée chez les souches de sensibilité intermédiaires à l'acide nalidixique (CMI 16 µg/ml). Ce qui à notre connaissance n'avait pas été décrit dans la littérature au paravant, cette mutation n'étant retrouvée jusqu'à présent que chez des souches présentant uniquement des CMIs de l'acide nalidixique élevées. Cette mutation ne semblerait donc avoir pour conséquence qu'une élévation plus ou moins marquée de la CMI de l'acide nalidixique sans que la CMI de la ciprofloxacine ne soit obligatoirement affectée.

Les deux mutations thréonine-86-alanine et thréonine-86-isoleucine étaient associées chacune à des CMIs très variées. Aucune mutation codante (entraînant un changement d'acide aminé) n'a été identifiée dans le QRDR du gène *gyrB* des souches portant ces mutations. De même, aucune des souches résistantes aux fluoroquinolones mais sans mutation dans le QRDR de GyrA, n'a montré de mutations codantes dans le QRDR du gène *gyrB*, suggérant que ce gène n'est pas impliqué dans la résistance aux fluoroquinolones chez *Campylobacter*. Le gène *parC* semble être absent chez *Campylobacter*. D'un autre côté, les mutations asparagine-203-serine et alanine-206-thréonine identifiées dans la région C-terminale de la protéine GyrA (spécialement chez *C. jejuni*) ne sont pas associées à la résistance aux fluoroquinolones puisque trouvées aussi bien chez les souches sensibles que résistantes à la ciprofloxacine. D'où l'hypothèse de l'existence d'autres mécanismes de résistance chez les souches sans mutation dans le QRDR de GyrA.

L'hypothèse sur l'existence de pompes à efflux chez ces souches résistantes aux quinolones mais sans mutation, a été écartée puisqu'elles étaient sensibles aux autres antibiotiques testés (bétalactamines, érythromycine et tétracycline). Aucun intégron de classe 1 n'a été détecté chez ces souches. La présence, dans la membrane externe de ces souches, de lipopolysaccharides (LPS) à très longues chaînes latérales et de haut poids moléculaires (100-150 Kd) mais aussi de LPS de structure intermédiaire, pourrait peut-être expliquer le phénotype de résistance de ces souches. En effet, ils peuvent freiner la diffusion des antibiotiques au travers des couches des phospholipides de la membrane externe.



**ÉTUDE 2 :**  
**Emergence des souches résistantes aux quinolones et  
étude de leur diversité**

## **INTRODUCTION**

La question posée ici est de savoir si l'émergence de la résistance aux quinolones était liée à la diffusion d'un ou plusieurs clones différents. Quels sont les différents géotypes et complexes clonaux rencontrés au Sénégal ?

## **1. MATERIEL ET METHODES**

### **1.1. Matériel**

#### **. Souches bactériennes**

Dans cette partie de notre travail, nous avons choisi au hasard un certain nombre de souches de *C. jejuni* et de *C. coli* parmi les souches de *Campylobacter* étudiées. Pour *C. jejuni*, 46 souches choisies au hasard (parmi 99 souches) étaient incluses dans cette étude. Parmi ces 46 souches, 19 étaient résistantes à la ciprofloxacine et à l'acide nalidixique, 3 étaient sensibles à la ciprofloxacine mais intermédiaires à l'acide nalidixique, et 24 étaient sensibles aux deux antibiotiques.

Pour *C. coli*, 33 souches étaient incluses dans cette étude. Ces souches étaient aussi choisies au hasard parmi 85 souches de *C. coli*. Il y avait au total 15 souches résistantes à la ciprofloxacine et à l'acide nalidixique, 17 sensibles aux deux antibiotiques et 1 résistant à la ciprofloxacine mais intermédiaire à l'acide nalidixique.

Les souches de *C. jejuni* et celles de *C. coli* incluses dans cette étude provenaient respectivement de 14 et 13 sites de collection tous différents.

### **1.2. Méthodes**

Pour savoir si l'émergence de la résistance aux quinolones était liée à la diffusion d'un ou plusieurs clones, nous avons choisi comme méthode la « *Multilocus Sequence Typing (MLST)* ».

#### **1.2.1. La MLST**

##### **Principe**

La MLST est un système de typage basé sur les séquences d'ADN. Cette méthode, développée très récemment, nécessite le séquençage de régions internes (d'environ 500 paires de base chacune) de 7 gènes. Elle utilise donc les variations génétiques (variations de séquence d'ADN) observées à l'intérieur de ces gènes. Cette méthode permet par exemple de suivre l'évolution des lignées de bactéries résistantes aux antibiotiques et d'en étudier leur diversité.

Cette méthode a été développée pour plusieurs bactéries dont *Campylobacter*. A chaque séquence unique d'un gène est attribué un numéro d'allèle unique. La combinaison des

numéros d'allèles des 7 gènes est appelée profil allélique. A chaque profil allélique unique est aussi attribué un numéro selon l'ordre de leur découverte, et est appelé séquence type (ST). Ces séquences types correspondent en réalité à des génotypes. Les séquences types peuvent être déposées dans la base de données MLST, laquelle contient les données des souches d'origines diverses. La technologie Internet actuelle est bien adaptée à la MLST. Le serveur Web de la base de données MLST est le point central permettant aux utilisateurs d'interroger et de comparer directement leurs souches avec celles de la base de données centrale, mais aussi de soumettre leurs souches en vue de leur inclusion dans la base de données. L'interface Web est très facile à utiliser et permet aux utilisateurs du monde entier de se connecter.

### **1.2.2. Extraction d'ADN**

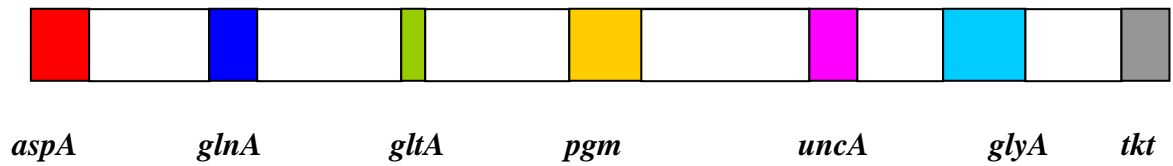
L'ADN des souches était extrait par ébullition comme décrit dans la partie mécanisme de résistance (étude 1).

### **1.2.3. Amplification des gènes par PCR**

La MLST pour *C. jejuni* et *C. coli* a été développée par Dingle et *al.* (2001 ; 2005). Les 7 gènes ciblés dans cette technique sont ceux codant pour les enzymes du métabolisme intermédiaire (Figure 12). Il s'agit de l'aspartase A (*aspA*), la glutamine synthétase (*glnA*), la citrate synthase (*gltA*), la sérine hydroxyméthyltransférase (*glyA*), la phosphoglucomutase (*pmg*), la transkétolase (*tkt*) et l'ATP synthase (*unca*). Les amorces et les conditions PCR sont celles décrites par Dingle et *al.* (2001 ; 2005). Les différents couples d'amorces sont consignés dans les tableaux XVI et XVII.

La PCR était faite dans un volume final de 50 µl. Pour *C. jejuni*, les concentrations finales des différents réactifs dans le mélange réactionnel étaient : tampon 1X (Promega), amorces 1µM chacune, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Promega), dNTP 0,8 mM (Amersham) et Taq polymérase (Promega) 0,025 U/µl (soit 1,25 U). Huit µl d'ADN étaient utilisés. Le programme PCR était le suivant :

- Dénaturation initiale : 94°C, 5 minutes
- 35 x (94°C, 2 minutes ; 50°C, 1 minute ; 72°C, 1 minute)
- Elongation finale : 72°C, 10 minutes



**Figure 12:** représentation schématique des régions amplifiées- MLST.

**Tableau XVI.** Amorces pour la MLST de *C. jejuni*.

Gènes	Amorces pour la MLST de <i>C. jejuni</i>		Amplification
<i>aspA</i>	asp-A9	5'-AGT ACT AAT GAT GCT TAT CC-3'	899 pairs de base (pb)
	asp-A10	5'-ATT TCA TCA ATT TGT TCT TTG C-3'	
<i>glnA</i>	gln-A1	5'-TAG GAA CTT GGC ATC ATA TTA CC-3'	1262 pb
	gln-A2	5'-TTG GAC GAG CTT CTA CTG GC-3'	
<i>gltA</i>	glt-A1	5'-GGG CTT GAC TTC TAC AGC TAC TGG-3'	1012 pb
	glt-A2	5'-CCA AAT AAA GTT GTC TTG GAC GG-3'	
<i>glyA</i>	gly-A1	5'-GAG TTA GAG CGT CAA TGT GAA GG -3'	816 pb
	gly-A2	5'-AAA CCT CTG GCA GTA AGG GC-3'	
<i>pgm</i>	pgm-A7	5'-TAC TAA TAA TAT CTT AGT AGG -3'	1150 pb
	pgm-A8	5'-CAC AAC ATT TTT CAT TTC TTT TTC -3'	
<i>tkt</i>	tkt-A3	5'-GCA AAC TCA GGA CAC CCA GG-3'	1102 pb
	tkt-A6	5'-AAA GCA TTG TTA ATG GCT GC-3'	
<i>unca</i>	unc-A7	5'-ATG GAC TTA AGA ATA TTA TGG C-3'	1120 pb
	unc-A2	5'-GCT AAG CGG AGA ATA AGG TGG-3'	

**Tableau XVII.** Amorces pour la MLST de *C. coli*.

Gènes	Amorces pour la MLST de <i>C. coli</i>		Amplification
<i>aspA</i>	aspcol.S1	5'-CAA CTT CAA GAT GCA GTA CC-3'	Environ 550 pb
	aspcol.S2	5'-ATC TGC TAA AGT ATG CAT TGC-3'	
<i>glnA</i>	glncol.S1	5'-TTC ATG GAT GGC AAC CTA TTG-3'	550 pb
	glncol.S2	5'-GCT TTG GCA TAA AAG TTG CAG-3'	
<i>gltA</i>	gltcol.S1	5'-GAT GTA GTG CAT CTT TTA CTC -3'	500 pb
	gltcol.S2	5'-AAG CGC TCC AAT ACC TGC TG -3'	
<i>glyA</i>	glycol.S1	5'-TCA AGG CGT TTA TGC TGC AC -3'	650 pb
	glycol.S2	5'-CCA TCA CTT ACA AGC TTA TAC -3'	
<i>pgm</i>	pgmcol.S1	5'-TTA TAA GGT AGC TCC GAC TG -3'	700 pb
	pgmcol.S2	5'-GTT CCG AAT AGC GAA ATA ACA C -3'	
<i>tkt</i>	tktcol.S1	5'-AGG CTT GTG TTT TCA GGC GG -3'	550 pb
	tktcol.S2	5'-TGA CTT CCT TCA AGC TCT CC -3'	
<i>unca</i>	unccol.S1	5'-AAG CAC AGT GGC TCA AGT TG -3'	600 pb
	unccol.S2	5'-CTA CTT GCC TCA TCC AAT CAC-3'	

Pour la PCR *C. coli*, les concentrations finales étaient les suivantes : tampon 1X (Promega), amorces 0,2 µM chacune, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Promega), dNTP 0,2 mM (Amersham) et Taq polymérase (Promega) 0,025 U/µl (soit 1,25 U). Cinq µl d'ADN étaient utilisés. Le programme PCR était le suivant :

- Dénaturation initiale : 95°C, 15 minutes
- 35 x (94°C, 30 secondes ; 50°C, 30 secondes; 72°C, 1 minute)
- Elongation finale : 72°C, 5 minutes

#### **1.2.4. Electrophorèse des produits issus de la PCR**

Le succès de l'amplification par PCR a été vérifié en faisant migrer les produits issus de la PCR par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1,5%. Le gel contenant les amplicons a été coloré au bromure d'éthidium, et la lecture a été faite dans une chambre noire sous UV.

#### **1.2.5. Purification des produits issus de la PCR**

Les produits issus de la PCR étaient purifiés en utilisant le kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) (comme dans la partie résistance).

#### **1.2.6. Séquençage des produits issus de la PCR**

Une fois purifiés, les ADN amplifiés étaient envoyés à la société Distribio (France) pour séquençage. Les amorces utilisées pour le séquençage étaient celles utilisées lors de la PCR du sauf pour *C. coli*. Par contre pour *C. jejuni*, d'autres amorces étaient utilisées pour le séquençage (Tableau XVIII). Ces amorces étaient nichées dans la région amplifiée. Tous les échantillons étaient séquençés dans les deux sens (direct et reverse).

Une fois le séquençage terminé, les séquences nous ont été adressées sous forme de résultats bruts (chromatogrammes) et sous forme de séquences textes. L'analyse de ces séquences a été ensuite effectuée.

#### **1.2.7. Analyse des séquences**

Les séquences corrigées d'ADN étaient sauvegardées sous forme de fichiers textes. Pour chaque gène séquençé, la région interne à analyser était identifiée par comparaison avec les séquences des allèles publiés disponibles en interrogeant la base de données MLST *Campylobacter* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Nous avons utilisé le logiciel CLUSTALW pour toutes les comparaisons des séquences. La taille des régions de gènes analysées est consignée dans le tableau XIX.

**Tableau XVIII.** Amorces pour séquençage MLST-*C. jejuni*

Gènes	Amorces pour le séquençage MLST - <i>C. jejuni</i>	
<i>aspA</i>	asp-S3	5'-CCA ACT GCA AGA TGC TGT ACC -3'
	asp-S6	5'-TTA ATT TGC GGT AAT ACC ATC -3'
<i>glnA</i>	gln-S3	5'-CAT GCA ATC AAT GAA GAA AC -3'
	gln-S6	5'-TTC CAT AAG CTC ATA TGA AC -3'
<i>gltA</i>	glt-S1	5'-GTG GCT ATC CTA TAG AGT GGC -3'
	glt-S6	5'-CCA AAG CGC ACC AAT ACC TG -3'
<i>glyA</i>	gly-S3	5'-AGC TAA TCA AGG TGT TTA TGC GG -3'
	gly-S4	5'-AGG TGA TTA TCC GTT CCA TCG C -3'
<i>pgm</i>	pgm-S5	5'-GGT TTT AGA TGT GGC TCA TG -3'
	pgm-S2	5'-TCC AGA ATA GCG AAA TAA GG -3'
<i>tkl</i>	tkl-S5	5'-GCT TAG CAG ATA TTT TAA GTG -3'
	tkl-S4	5'-ACT TCT TCA CCC AAA GGT GCG -3'
<i>uncA</i>	unc-S5	5'-TGT TGC AAT TGG TCA AAA GC -3'
	unc-S4	5'-TGC CTC ATC TAA ATC ACT AGC -3'

**Tableau XIX.** Taille des régions analysées par la MLST.

Régions analysées de gènes et leur taille							
Gène	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>uncA</i>
Taille (pb)	477	477	402	507	498	459	498

### 1.2.7.1. Identification des allèles et des séquences types (ST)

#### - Allèles

Pour chaque gène, les différents allèles étaient identifiés en interrogeant la base de données MLST *Campylobacter*. En effet, la base MLST (accessible via Internet) dispose d'une fenêtre par laquelle on peut soumettre les séquences d'ADN (séquences textes) pour savoir à quels allèles elles correspondent exactement (Figure 13). Donc, à chaque séquence unique d'un gène est attribué un numéro d'allèle unique (exemple allèle 1, allèle 2...). Ce qui veut dire que toutes les séquences identiques d'un gène auront le même numéro d'allèle. Par contre, lorsque la séquence soumise n'était pas connue de la base de données, le logiciel incorporé à la base de données indiquait automatiquement que c'était un nouvel allèle ; les chromatogrammes (direct et reverse) de cet allèle étaient envoyés au gestionnaire de la base de données. Une fois les chromatogrammes validés, et qu'il s'agissait bien d'un nouvel allèle, un nouveau numéro d'allèle lui était attribué.

## Campylobacter jejuni and Campylobacter coli MLST multiple locus query

Enter sequences (DNA) below using copy and paste:

aspA	<input type="text"/>	glnA	<input type="text"/>
gltA	<input type="text"/>	glyA	<input type="text"/>
pgm_	<input type="text"/>	tkt_	<input type="text"/>
uncA	<input type="text"/>		

Rétablir

Soumettre la requête

**Figure 13.** Fenêtre de la base MLST pour la détermination des allèles des 7 gènes séquencés. Pour un gène donné, sa séquence est rentrée dans la « petite fenêtre » indiqué pour ce gène.

## - Séquences types (ST)

Une fois les allèles des 7 gènes identifiés, chaque souche était représentée par une combinaison de 7 chiffres appelée profil allélique. Chaque profil allélique était désigné par un nombre, et ce nombre était appelé séquence type (ST), obtenu en soumettant les différents profils alléliques dans la base de données via une fenêtre spéciale réservée à ceux-ci (Figure 14). Lorsqu'un nouveau profil allélique était identifié, il était envoyé au gestionnaire de la base et une ST lui était assignée. A la fin, chaque souche était désignée par une séquence type. Toutes les souches ayant le même profil allélique étaient désignées par une même ST. Il faut noter que chaque ST constitue un génotype.

Query: [Locus](#) | [Multiple Locus](#) | [Batch Locus](#) | [BLAST](#) | [Compare alleles](#) | [Profile](#) | [Batch Profile](#) | [ST](#) | [List](#) | [Search](#)  
Download: [Alleles](#) | [Profiles](#)  
Links: [Contents](#) | [Home](#) | [Options](#) | [PubMLST.org](#) | [mlstdbNet software](#) | [User guide](#)

### Allelic profile query - *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* MLST database

Please enter your allelic profile below:

aspA	glnA	gltA	glyA	pgm_	tkl_	uncA
2	63	1	93	11	3	6

Type of search:

Order by:

Display  records per page

Your sequence type: 1358

**1 record returned.**

st	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm_	tkl_	uncA	clonal_complex
1358	2	63	1	93	11	3	6	-

**Figure 14.** Fenêtre de la base MLST pour la détermination des ST.



### **1.2.7.2. Identification des lignées et complexes clonaux**

L'intérêt de cette partie est de pouvoir suivre l'évolution des souches résistantes mais aussi leur diversité.

Les différentes lignées des souches étaient identifiées en utilisant le programme BURST intégré dans le logiciel START (Jolley et *al.*, 2001). Il fallait donc entrer les noms des souches, leurs profils alléliques et leurs ST respectives dans le logiciel. Les souches étaient groupées ensemble dans une même lignée quand elles avaient au moins 5 allèles identiques. Le schéma d'évolution des souches au sein d'une lignée était retracé grâce au logiciel eBURST (Feil et *al.*, 2004). L'analyse des sites polymorphiques au sein des séquences d'ADN était faite grâce au logiciel DnaSP version 4.00 (Rosa et *al.*, 2003). Ce programme est disponible sur Internet à l'adresse <http://www.ub.edu/dnasp/> (Dernière visite du site, 30 Mai 2006).

## 2. RESULTATS

Les amplifications des gènes par la MLST sont illustrées par la figure 15.

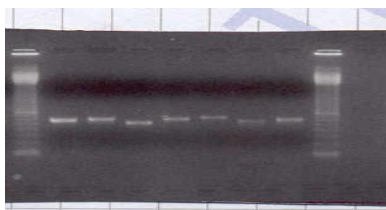


Figure 15. Amplification par PCR de 7 gènes pour la MLST *C. coli*.

### 2.1. Allèles

Le nombre d'allèles variait de 4 (gène *unca*) à 9 (gène *glnA*) pour *C. jejuni*, et de 2 (gène *aspA*) à 7 (gène *pgm*) pour *C. coli* (Tableau XX). Le pourcentage de sites variables variait de 0,6% (*unca*) à 4,8% (*pgm*) pour *C. jejuni*, et 0,209% (*glnA*) à 15,03% (*tkt*) pour *C. coli*. La grande variabilité au locus *tkt* chez *C. coli* était causée par un allèle unique (allèle 3) caractéristique de *C. jejuni*. En effet, quand cet allèle était exclu de l'analyse, le pourcentage de site variable au locus *tkt* tombait à 0,653%.

Tableau XX. Nombre d'allèles et de sites variables.

Gène	Taille des régions analysées	Nombre d'allèles		Nombre et pourcentage de sites variables	
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
<i>aspA</i>	477	5	2	6 (1,3%)	19 (3,98%)
<i>glnA</i>	477	9	2	13 (2,7%)	1 (0,209%)
<i>gltA</i>	402	6	4	6 (1,5%)	3 (0,746)
<i>glyA</i>	507	6	5	22 (4,3%)	4 (0,788%)
<i>pgm</i>	498	8	7	24 (4,8%)	15 (3,012%)
<i>tkt</i>	459	7	5	17 (3,7%)	69 (15,03%)*
<i>unca</i>	489	4	3	3 (0,6%)	2 (0,408)

\* quand l'allèle *tkt-3* était exclu de l'analyse, le pourcentage de site variable tombait à 0,653% chez *C. coli*.

### 2.2. Séquences types (ST)

Il y avait au total 16 ST parmi les 46 souches de *C. jejuni* analysées (Tableau XXI). Plusieurs de ces ST (ST1035, 1036, 1037, 1038, 1039, 1040, 1041, 1081, 1358, 1359 et 1370) n'avaient jamais été décrites antérieurement d'après les données disponibles dans la base MLST *Campylobacter* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) (Dernière visite du site Web, le 30 Mai 2006).

Pour *C. coli*, 13 ST étaient identifiées parmi les 33 souches analysées et 8 d'entre elles (ST1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605, 1610 et 1611) ont été décrites pour la première fois dans cette étude (Tableau XXII).

**Tableau XXI.** Profils alléliques et ST des souches de *C. jejuni*.

Souches	Profils alléliques							ST
	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkf</i>	<i>uncA</i>	
84C	2	63	1	93	11	3	6	1358
110A	7	2	5	10	10	37	1	1035
112A	7	84	1	10	11	3	6	1040
78A	7	2	5	10	10	37	1	1035
78C	7	2	5	10	10	37	1	1035
76B	7	2	5	10	10	37	1	1035
76A	7	2	5	10	10	37	1	1035
82A	7	84	5	10	11	3	6	1036
41BP	1	2	42	4	235	40	3	1370
57A	2	4	119	25	11	3	5	1039
55A	9	25	2	10	22	3	6	52
95A	2	4	119	25	11	3	5	1039
103C	9	2	2	2	11	5	6	824
F18	2	4	119	25	89	3	5	1041
118B	1	3	6	4	54	91	6	1081
93A	7	84	1	10	11	3	6	1040
110B	7	2	5	10	10	37	1	1035
118C	7	84	5	10	11	3	6	1036
106B	8	10	5	153	11	12	6	1037
F19	7	84	5	10	11	3	6	1036
113B	7	84	1	10	11	3	6	1040
65C	7	84	5	10	11	3	6	1036
65A	7	84	5	10	11	3	6	1036
48B	7	84	5	10	11	3	6	1036
48A	7	84	5	10	11	3	6	1036
65B	7	84	5	10	11	3	6	1036
90B	2	1	5	10	2	1	5	1359
116B	7	84	5	10	11	3	6	1036
104C	7	84	5	10	11	3	6	1036
V34A	8	10	5	2	11	12	6	1038
95B	2	4	119	25	11	3	5	1039
83B	7	84	5	10	11	3	6	1036
76C	7	2	5	10	10	37	1	1035
75A	2	4	119	25	11	3	5	1039
72B	9	25	2	10	22	3	6	52
64C	2	4	119	25	89	3	5	1041
62A	2	4	119	25	89	3	5	1041
50C	2	4	119	25	11	3	5	1039
47C	9	25	2	10	22	3	6	52
44B	9	25	2	10	22	3	6	52
130A	7	2	5	10	10	37	1	1035
118A	1	3	6	4	54	91	3	660
117C	1	3	6	4	3	3	3	22
115 B	8	10	5	2	11	12	6	1038
115 A	7	17	5	2	10	3	3	1211
113A	8	10	5	2	11	12	6	1038

**Tableau XXII.** Profils alléliques et ST des souches de *C. coli*.

Souches	Profils alléliques							ST
	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkt</i>	<i>unca</i>	
109C	33	39	65	140	104	43	17	1600
42A	33	39	30	82	104	43	41	1017
52B	33	39	66	174	104	43	41	1181
55B	131	39	150	82	248	43	17	1601
58C	33	39	66	174	104	43	136	1602
103A	33	39	30	79	104	35	17	855
66A	33	39	30	82	104	43	41	1017
59A	33	39	65	140	104	43	17	1600
60A	33	39	65	140	104	43	17	1600
61A	33	39	30	82	104	43	41	1017
79A	33	39	65	140	104	43	17	1600
69B	33	39	30	82	104	205	17	1603
70B	131	39	150	82	248	43	17	1601
F33	33	39	65	140	104	43	17	1600
F13	33	39	30	82	188	43	41	1604
F16	33	39	66	174	104	43	41	1181
58A	33	39	30	82	189	43	17	1585
79C	33	39	65	140	104	43	17	1600
60C	33	39	66	174	65	43	41	1610
V19B	33	176	30	200	113	47	17	1605
F25	33	39	66	174	104	43	41	1181
127A	33	39	30	82	104	43	41	1017
51B	33	39	30	82	104	205	17	1603
59B	33	39	66	174	104	43	41	1181
63B	33	39	30	82	104	43	41	1017
64A	33	39	65	140	104	43	17	1600
126C	33	39	30	82	104	43	41	1017
63C	33	39	30	82	104	43	41	1017
101B	33	39	65	140	247	3	17	1611
F37	33	39	30	82	188	43	41	1604
F42	33	39	30	82	113	47	17	825
83C	33	39	30	82	188	43	41	1604
106C	33	39	30	79	104	35	17	855

### 2.3. Lignées

En utilisant le programme BURST, les 46 souches de *C. jejuni* étaient classées en 4 lignées ou groupes (Tableau XXIII), et 7 ST (singletons) n'étaient liées à aucune autre ST (les souches dans un groupe partageant au moins 5 allèles identiques). La ST1036 était la plus fréquente avec 11 souches (23,91 % des souches) suivie par la ST1035 (8 souches, soit 17,39% des souches) et ST1039 (5 souches, soit 10,87%). Les 7 ST singletons (ST1370, 1359, 1358, 1211, 1035, 842 et 52) étaient identifiées dans 17 souches (36,95%).

Au total, 7 complexes clonaux (les complexes ST-21, 22, 42, 52, 257, 353 et ST-354) étaient identifiés en soumettant les différentes ST dans la base de données MLST. Dans chaque complexe, le nombre de souches variait de 1 (complexes ST-21, 42 et 257) à 12 (complexe ST-353). L'analyse eBURST nous a permis de déterminer la relation entre la ST1040 (non assignée à aucun complexe connu) et ST1036 (complexe ST-353) d'une part, et la ST1211 d'autre part (Figure 16). En effet, l'analyse BURST a montré que la ST1040 et la ST1036 appartenaient au groupe 1 alors que la ST1211 (membre aussi du complexe ST-353) était placée parmi les singletons. Les autres ST non assignées à aucun complexe connu étaient la ST1035 et la ST1358.

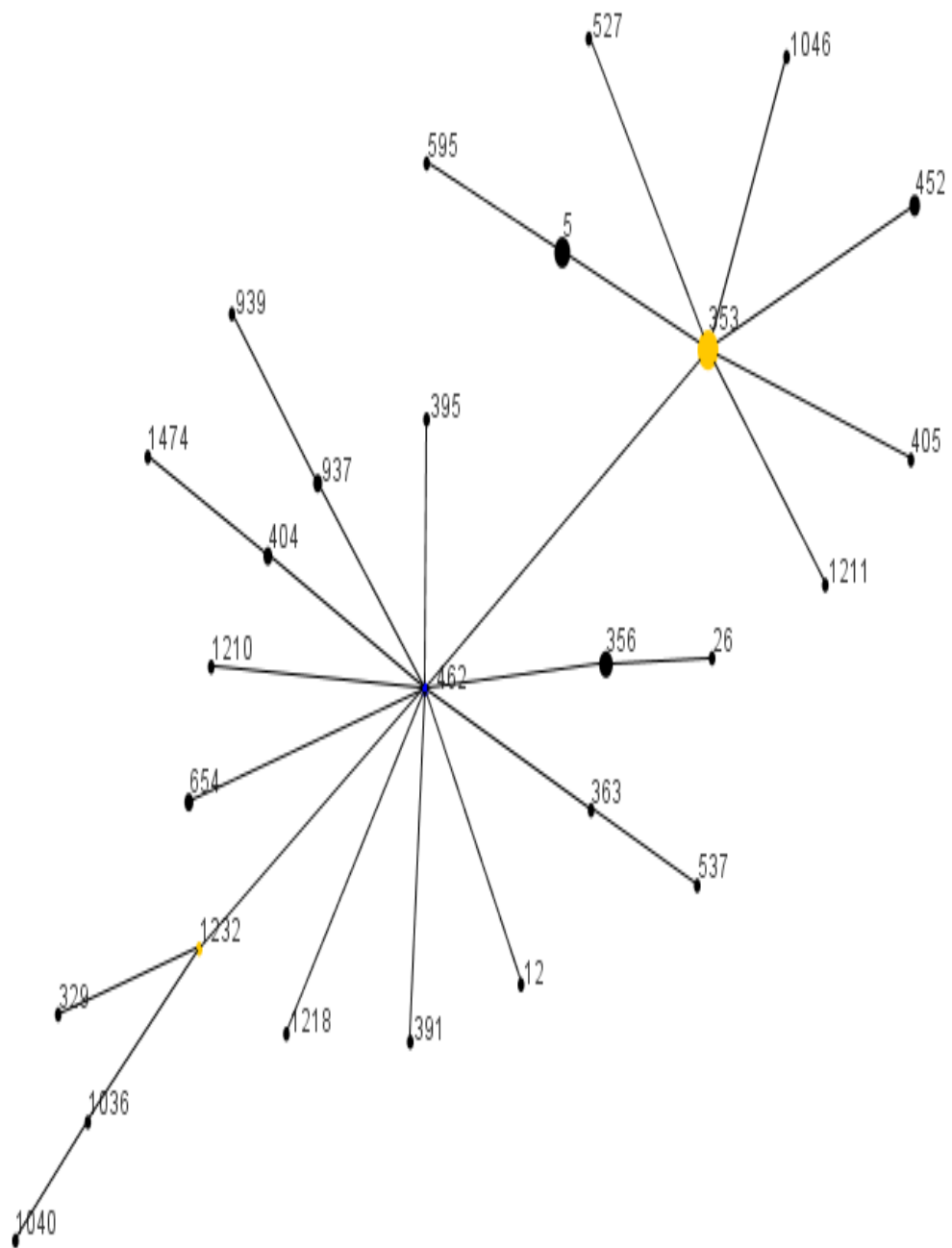
Pour *C. coli*, BURST classait les 33 souches dans deux groupes seulement, avec 2 ST singletons (Tableau XXIV). Les ST prédominantes étaient la ST1600 et ST1017 (7 souches chacune, soit 21,21%) suivies par la ST1181. La quasi-totalité des souches (ST1611, 1610 et 1605 exceptées) appartenait au complexe ST-828 d'après les données disponibles dans la base de données MLST (<http://pubmlst.org/campylobacter/>).

**Tableau XXIII.** Lignées, mutations du *gyrA* et phénotypes de résistance des souches de *C. jejuni*.

Lignées BURST	Complexe clonal	ST	Souches	Année	Mutations du <i>gyrA</i> <sup>a</sup>	Phénotypes <sup>b</sup>					
						CIP	NAL				
Groupe 1	353	1036	83B	2001	His-81, Ser-119	S	S				
			104C	2002	His-81, Ser-119	S	S				
			116B	2002	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile, Gly-110	R	R				
			65B	2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R				
			48A	2000	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R				
			48B	2000	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R				
			65A	2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R				
			65C	2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R				
			F19	2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R				
			118C	2002	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile, Gly-110	R	R				
			82A	2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R				
			Pas assigné	1040	113B	2002	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R		
					93A	2001	His-81, Ser-119	S	S		
					112A	2002	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R		
Groupe 2	Pas assigné	1039			50C	2000	His-81, Ser-119	S	S		
			75A	2001	His-81, Ser-119	S	S				
			95B	2001	His-81, Ser-119	S	S				
			95A	2001	His-81, Ser-119	R	R				
			57A	2001	His-81, Ser-119	S	S				
			1041	62A	2001	His-81, Ser-119	S	S			
				64C	2001	His-81, Ser-119	S	S			
				F18	2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ala, Gly-110	R	R			
			Groupe 3	22	1081	118B	2002	none	S	S	
						660	2002	none	S	S	
						22	2002	none	S	S	
			Groupe 4	354	1037	106B	2002	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R	
						1038	113A	2002	His-81, Ser-119	S	S
							115B	2002	His-81, Ser-119	S	S
V34A	2002	His-81, Ser-119				S	S				
ST Singleton	52	52				44B	2000	His-81, Ser-119	S	S	
						47C	2000	His-81, Ser-119	S	S	
						72B	2001	His-81, Ser-119	S	S	
						55A	2001	His-81, Ser-119	S	S	
						257	824	103C	2002	His-81, Ser-119	S
Pas assigné	1359	1211				90B	2001	His-81, Ser-119	S	S	
			353	115A	2002	His-81, Ser-119	S	S			
				42	1370	41B	2000	His-81, Ser-119	S	S	
			1358	84C	2001	His-81, Ser-119	R	R			
				1035	130A	2000	His-81, Ser-119, Gly-110	S	S		
			76C		2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ala, Gly-110	S	I			
			110B		2002	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile, Gly-110	R	R			
			76A		2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ala, Gly-110	S	I			
			76B		2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ala, Gly-110	S	I			
			78C		2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ala, Gly-110	R	R			
			78A		2001	His-81, Ser-119, Thr-86-Ala, Gly-110	R	R			
			110A	2002	His-81, Ser-119, Thr-86-Ile	R	R				

<sup>a</sup> mutations silencieuses : His-81 (CAC→CAT), Ser-119 (AGT →AGC) et Gly-110 (GGC→GGT)

<sup>b</sup> CIP : ciprofloxacine, NAL : acide nalidixique, S : sensible, Résistant, I : intermédiaire



**Figure 16.** Relation génétique entre les souches de *C. jejuni* appartenant au complexe ST-353 et celles de génotype ST1040 par l'analyse eBURST. La ST1036 est l'ancêtre de la ST1040.

**Tableau XXIV.** Lignées, mutations du *gyrA* et phénotypes de résistance des souches de *C. coli*.

Lignée BURST	Complexe clonal	ST	Souches	Année	Mutation du gène <i>gyrA</i> <sup>a</sup>	Phénotype <sup>b</sup>				
						CIP	NAL			
Group 1	828	1600	109C	2002	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			59A	2001	Phe-99	S	S			
			60A	2001	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			79A	2001	Phe-99	S	S			
			F33	2001	Phe-99	S	S			
			79C	2001	Phe-99	S	S			
			64A	2001	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			Group 2	pas assigné 828	1611 1017	101B	2002	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R
						42A	2000	Phe-99	S	S
						66A	2001	Phe-99	S	S
						61A	2001	Phe-99	S	S
						127A	2002	Phe-99	S	S
						63B	2001	Phe-99	S	S
						126C	2002	Phe-99	R	R
		1181	63C	2001	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			52B	2001	Phe-99	S	S			
			F16	2001	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			F25	2001	Phe-99	S	S			
			59B	2001	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			1602	2001	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			855	2002	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			106C	2002	Phe-99	R	I			
			1603	2001	Phe-99	S	S			
			51B	2001	Phe-99	S	S			
			1604	2001	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			F37	2002	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
			83C	2001	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
1585	2001	Phe-99	S	S						
Singleton	Pas assigné Pas assigné 828	1610 1605 825	60C	2001	Phe-99	R	R			
			V19B	2000	Phe-99	S	S			
			F42	2002	Thr-86-Ile, Phe-99	R	R			
		1601	55B	2001	Phe-99	S	S			
			70B	2001	Phe-99	S	S			

<sup>a</sup> Mutation silencieuse : Phe-99 (TTT→TTC)

<sup>b</sup> CIP : ciprofloxacine, NAL : acide nalidixique, S : sensible, Résistant, I : intermédiaire

#### 2.4. Relation entre ST phénotype de résistance et mutation du gène *gyrA*.

Chez les souches de *C. jejuni*, et dans tous les groupes (groupe 2 excepté), le phénotype de résistance variait pour chaque ST (Tableau XXIII). Cependant, certains phénotypes étaient prédominants. Dans le groupe 1 par exemple, le phénotype le plus courant était celui montrant une résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine, alors que les groupes 2 et 4 ne contenaient que des souches sensibles. Le phénotype de résistance était aussi variable dans les ST singletons.



Chez *C. coli* aussi, et dans les deux groupes (Tableau XXIV), le phénotype de résistance variait pour la même ST. Les deux ST singletons représentaient des souches sensibles.

Onze des 14 souches de *C. jejuni* ayant la mutation thréonine-86-isoleucine appartenaient au complexe ST-353 alors que celles de *C. coli* appartenaient au complexe ST-828.

En se basant sur les mutations silencieuses du *gyrA*, différents variants du gène *gyrA* pouvaient exister pour une même ST chez *C. jejuni* : le premier avec des mutations silencieuses au niveau de His-81 (CAC→CAT) et Ser-119 (AGT →AGC), et le deuxième variant avec une mutation silencieuse additionnelle au niveau de la Gly-110 (GGC→GGT). Chez *C. coli* par contre, un seul variant du *gyrA* était identifié : celui avec une mutation silencieuse au niveau de la Phe-99 (TTT→TTC).

### 3. DISCUSSION

Dans cette partie de notre travail, nous avons exploré les relations clonales des souches de *Campylobacter* résistantes aux quinolones. Bien que le nombre de souches analysées aie été relativement faible, leur diversité a été établie par la présence de plusieurs génotypes et complexes clonaux variés.

En terme de nombre d'allèles et de sites variables, les souches de *C. coli* étudiées sont apparues moins variables que celles de *C. jejuni*. Ce résultat est en phase avec une étude récente suggérant que les souches de *C. coli* isolées du poulet étaient moins variables que celles de *C. jejuni* (Fitch et al., 2005). La seule exception était le locus *tkt* au niveau duquel une grande variabilité était observée chez *C. coli*. Cette grande variabilité était liée à la présence de l'allèle *tkt-3* (caractéristique de *C. jejuni*) dans la souche de *C. coli* ayant pour génotype ST1611. En effet, l'allèle *tkt-3* était très fréquent dans la population de *C. jejuni*. La recherche Blast dans la banque de données Genbank confirmait qu'il s'agissait bien d'un allèle caractéristique de *C. jejuni*. Par conséquent, cet allèle aurait été hérité à la suite d'une recombinaison interspécifique. Des échanges génétiques similaires avaient été rapportés (Dingle et al., 2005), et joueraient un rôle dans l'évolution du genre *Campylobacter*.

Dans ce travail, 7 complexes clonaux étaient identifiés chez *C. jejuni* contre 1 seul chez *C. coli*, et tous étaient déjà rapportés en pathologie humaine (Duim et al., 2003 ; Schouls et al., 2003). Contrairement à d'autres études pour lesquelles le complexe ST-21 était le plus large (Colles et al., 2003 ; Dingle et al., 2001), il semble être moins répandu dans les poulets du Sénégal puisque son unique génotype associé (ST1359) n'a été observé qu'une seule fois parmi nos souches. Les autres complexes moins bien représentés étaient les complexes ST-42 et ST-257. En Europe, ces complexes avaient été identifiés chez des hôtes très variés d'origine animale (Colles et al., 2003 ; Manning et al., 2003 ; Schouls et al., 2003), mais aussi dans les isolats humains, suggérant qu'ils ont une large distribution. Le complexe ST-353, le plus courant chez *C. jejuni* dans ce travail, les complexes ST-22, ST-354 et ST-828 avaient déjà été rapportés dans la volaille (Manning et al., 2003). D'autres études ont montré qu'ils contenaient des souches associées à la gastroentérite (Dingle et al., 2002 ; Duim et al., 2003 ; Manning et al., 2003). En effet, la recherche dans la base de données MLST a révélé que ces complexes contenaient en majorité des souches d'origine humaine. Donc, malgré le manque des données MLST des souches humaines au Sénégal, on peut envisager que ces complexes pourraient peut-être correspondre à des souches pathogènes pour l'homme.

Beaucoup de ST étaient décrites ici pour une première fois, et certaines ne sont assignées à aucun complexe clonal connu. Dans le groupe 1 de *C. jejuni* par exemple, la MLST a montré que les souches ayant le génotype ST1040 (non assignées à aucun complexe connu) diffèrent de celles ayant le génotype ST1036 (lesquelles appartiennent au complexe clonal ST-353) par un allèle. L'analyse eBURST de toutes les souches du complexe clonal ST-353 de la base de données MLST incluant celles de génotype ST1040, a montré que les souches de génotype ST1040 dérivent de celles ayant le génotype ST1036 (Figure 14). La seule différence entre les deux génotypes reposait sur le polymorphisme d'un seul nucléotide sur la séquence du gène *gltA*. Par conséquent, la ST1040 a certainement divergé très récemment de la ST1036. Il est aussi apparu grâce aux analyses eBURST et BURST que la ST462 est le fondateur du complexe clonal ST-353 plutôt que la ST353. Ainsi, au fur et à mesure que les données sont ajoutées dans la base de données MLST, de nouveaux liens seront découverts, et il est probable que les conclusions sur les fondateurs des complexes clonaux devront être modifiées. eBURST nous a aussi montré la relation entre la ST1211 et ST1036. En effet, la ST1211 était classée parmi les singletons par BURST bien que les deux (ST1211 et ST1036) appartiennent au complexe ST-353. Nous avons expliqué cette classification par l'absence de ST intermédiaires (ST1232, 462 et 353 non présentes parmi nos souches) entre la ST1211 et la ST1036, mais aussi par le fait que 3 allèles seulement sur 7 étaient partagés entre les deux. Les ST singletons n'étaient pas négligeables (36,95% des souches) dans cette étude. Elles représentent des génotypes très éloignés (non liés à d'autres génotypes). Nous pensons qu'avec plus de données MLST, de nouveaux liens seront découverts.

Bien que le nombre de souches analysées soit petit pour tirer une conclusion définitive, certains complexes clonaux (ST-353, ST-354, ST-52 et ST-828) et certaines ST (ST1035, 1036, 1039, 1600 et 1017) semblent être prédominants même si d'autres complexes et ST peuvent toujours être présents dans les poulets du Sénégal.

Comme nous l'avons montré dans la première partie de notre travail, la mutation thréonine-86-isoleucine était le mécanisme de résistance prédominant aux quinolones. Au Sénégal, les fluoroquinolones étaient introduites dans la filière avicole en 1996 (Cardinale et al., 2003). Leur utilisation est devenu un facteur important de sélection de clones résistants à ces antibiotiques. Le fait que la résistance aux quinolones aie été observée dans les ST de lignées différentes (excepté le complexe ST-22) suggère que l'émergence de la résistance aux quinolones n'était pas liée à la diffusion d'un clone unique mais était plutôt le résultat de la pression de sélection des quinolones sur des clones différents.

Il pourrait y avoir une relation entre les souches portant la mutation thréonine-86-isoleucine et le complexe ST-353 pour *C. jejuni*, et le complexe ST-828 pour *C. coli*.

Il est aussi apparu que différents variants du gène *gyrA* pouvaient exister pour le même génotype ST. Ce qui illustre la variabilité du génome de *Campylobacter* en dehors des régions analysées par la MLST. Il avait été proposé que le polymorphisme du *gyrA* pouvait être utilisé dans les études épidémiologiques (Hakanen et al., 2002 ; Zirnstein et al., 1999). Nous pensons qu'il peut fournir des informations utiles pouvant compléter les données obtenues par l'approche MLST dans la compréhension de l'épidémiologie de cette bactérie.

D'une manière générale, les souches avec la même ST présentaient des phénotypes de résistance différents. Ce qui suggère qu'il n'y a pas de lien entre ST et résistance aux quinolones.

#### 4. CONCLUSION

Plusieurs génotypes (ST) et complexes ont été identifiés chez les souches de *Campylobacter* isolées du poulet au Sénégal. Mais les souches de *C. coli* étudiées sont apparues moins variables que celles de *C. jejuni*. La majorité des complexes clonaux identifiés dans ce travail avaient déjà été rapportés dans les cas de gastroentérite, suggérant qu'ils pourraient s'agir de souches pathogènes.

La MLST a montré que l'émergence de la résistance aux quinolones n'était pas liée à la diffusion d'un clone unique, mais au contraire, qu'elle était le résultat de la pression de sélection des quinolones sur des souches de clones différents. La MLST a aussi montré qu'il n'y a pas de lien entre ST et la résistance aux quinolones. Il est aussi apparu que différents variants du gène *gyrA* pouvaient exister pour une même séquence type, et que ce polymorphisme peut fournir des informations utiles pouvant compléter les données fournies par la MLST, données qui sont nécessaires à la compréhension de l'épidémiologie de cette bactérie.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans ce travail nous avons exploré les mécanismes de résistance aux quinolones, la diversité et l'émergence des souches de *Campylobacter* isolées du poulet au Sénégal. Bien que la mutation thréonine-86-isoleucine était le mécanisme de résistance prédominant aux fluoroquinolones, certaines souches exprimaient des mécanismes de résistances inhabituels. Aucune autre mutation supplémentaire pouvant expliquer la variation des CMI obtenues n'a été détectée dans les topoisomérases II et IV.

La MLST a révélé non seulement l'existence de génotypes et complexes clonaux variés mais aussi les échanges génétiques entre *C. jejuni* et *C. coli*. En tenant compte du nombre limité des souches analysées, il est possible que d'autres génotypes et complexes clonaux existent dans les souches du Sénégal. Il est aussi apparu que *C. coli* est moins variable que *C. jejuni*, et que certaines des souches analysées pourraient être des souches pathogènes. La MLST a aussi montré que l'émergence de la résistance aux quinolones n'était pas liée à la diffusion d'un clone unique, mais au contraire, elle est le résultat de la pression de sélection des quinolones sur des souches de clones différents.

A ce jour, très peu de données sont disponibles en ce qui concerne l'épidémiologie des *Campylobacter* au Sénégal. Principalement, il n'y a pas de données sur les souches humaines du fait que beaucoup de laboratoires cliniques ne recherchent pas systématiquement les *Campylobacter* dans les prélèvements. Dans le futur, d'autres études avec un plus grand nombre de souches et incluant celles d'origine humaine, sur une large période de temps, pourront fournir encore plus de données sur l'épidémiologie des *Campylobacter* au Sénégal.

L'évolution de la résistance aux quinolones chez *Campylobacter* devrait donc faire l'objet d'une grande surveillance. De même, l'utilisation des quinolones dans la filière aviaire devrait être limitée ou carrément supprimée afin d'éviter la sélection des souches résistantes.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarestrup F., Engberg J. (2001). "Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*." Vet. Res. 32: 311-321.
- Aarestrup F., Nielsen E., Madsen M, Engberg J. (1997). "Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from Humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark." Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2244-2250.
- Allos B. M. (1995). "*C. jejuni* and the expanding spectrum of related infections." Clin. Infect. Dis. 20: 1092-1099.
- Anonymous. (2002). "Control of *Campylobacter* species in food chain." Food Safety Authority of Ireland.: pp. 1-2.
- Avrain (2003). "Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use." Vet. Microb. 96: 267-276.
- Bachoual R., Ouabdesselam S., Mory F., Lascols C., Soussy C.J., and Tankovic J. (2001). "Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*." Microb. Drug. Resist. 7: 257-61.
- Bacon D.J., Alm R. A., Burr D.H., Hu L., Kopecko D.J., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P. (2000). "Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176." Infect. Immun. 68: 4384-4390.
- Bissonnette L., Roye P.H. (1992). "Characterization of integron of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram negative bacteria." J. Bacteriol. 174: 1248-57.
- Blaser M.J. (1997). "Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections." J. Infect. Dis. 176: Suppl 2, S103-S105.
- Bogard M., Lamoril J. (1998). "Biologie moléculaire en biologie clinique." I. methodes, Collection, Option-Bio: 55-90.
- Butzler J.P. (2004). "*Campylobacter*, from obscurity to celebrity." Clin. Microbiol. Infect. 10: 868-876.
- Cabral J. H., Jackson A.P., Smith C.V., Shikotra N., Maxwell A., Liddington R.C. (1997). "Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase." Nature 388: 903-906.
- Cardinale E., Dromigny J.A., Tall F., Ndiaye M., Konte M., and Perrier-Gros-Claude J.D. (2003). "Fluoroquinolone susceptibility of *Campylobacter* strains, Senegal." Emerg. Infect. Dis. 9: 1479-81.
- Champoux (2001). "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism." Ann. Rev. Biochem. 70: 369-413.

Charvin G. (2004). Etude de topoisomérase de type II par micromanipulation d'ADN. Département de Physique. Paris, Université Paris 7, Ecole Normale Supérieure. Doctorat de l'université Paris 7: 184.

Chatzipanagiotou (2005). "Absence of the plasmid-mediated quinolone resistance *qnrA* gene among *Campylobacter jejuni* clinical isolates from Greece." Int. J. Antimicrob. Agents. 26: 261-263.

Coker A.O., Isophi R.D., Thomas B.N., Amisu K.O., and Obi L. (2002). "Human campylobacteriosis in developing countries." Emerg. Infect. Dis. 8: 237-243.

Colles, F. M., Jones K., Harding R.M., and Maiden M.C.J.. (2003). "Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from farm animals and the farm environment." Appl. Environ. Microbiol. 69: 7409-7413.

Cooper R., Segal H., Lastovica A.J., and Elisha B.G. (2002). "Genetic basis of quinolone resistance and epidemiology of resistant and susceptible isolates of porcine *Campylobacter coli* strains." J. Appl. Microbiol. 93: 241-249

Denis M, Soumet C., Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P. (1999). "Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*." Lett. Appl. Microbiol. 29: 406-10.

Dingle K.E., Colles F.M., Falush D., and Maiden M.C.J. (2005). "Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*." J. Clin. Microbiol. 43: 340-347.

Dingle K.E., Colles F.M., Ure R., Wagenaar J.A., Duim B., Bolton F.J., Fox A.J., Wareing D.R.A., and Maiden M.C.J. (2002). "Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation." Emerg. Infect. Dis. 8: 949-955.

Dingle K.E., Colles F.M., Wareing D.R.A., Ure R., Fox A.J., Bolton F.E., Bootsma H.J., Willems R.J. L., Urwin R., and Maiden M.C.J. (2001). "Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*." J. Clin. Microbiol. 39: 14-23.

Dionisi A.M., Luzzi I., Carattoli A. (2004). "Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* and analysis of the *gyrA* gene by the LightCycler mutation assay." Mol. Cell. Prob. 18: 255-261.

Drlica K, Zhao X. (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 377-92.

Duim B., Godschalk P.C.R., Braak N.V.D., Dingle K.E., Dijkstra J.R., Leyde E., Plas J.V.D., Colles F.M., Endtz H.P., Wagenaar J.A., Maiden M.C.J., and Belkum A.V. (2003). "Molecular evidence for dissemination of unique *Campylobacter jejuni* clones in Curaçao, Netherlands Antilles." J. Clin. Microbiol. 41: 5593-5597.

Endtz H.P., Ruijs G. J., Van Klingeren B., Jasen W.H. Van der Reyden T., Mouton R.P. (1991). "Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the



introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine." J. Antimicrob. Chemother. 27: 199-208.

Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., and Nachamkin I. (2001). "Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates." Emerg. Infect. Dis. 7: 24-34.

Engberg J., Andersen S., Skov R., Aarestrup F., Gerner-Smidt P. (1999). "Comparison of two agar dilution methods and three agar diffusion methods including the Etest for antibiotic susceptibility testing of thermophilic *Campylobacter* species." Clin. Microbiol. Infect. 5: 580-584.

Espeli O., Levine C., Hassing H., and Mariani K.J. (2003). "Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*." Mol. Cell. 11: 189-201.

Euzéby J.P. (1998). "Dictionnaire de bactériologie vétérinaire."

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/campylobacter.html>

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/teampylo3.html>

Fauchère J.L. (1988). "*Campylobacter*." Information du Technicien Biologiste 4: 187-192.

Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P., and Spratt B.G. (2004). "eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among cluster of related Bacterial genotypes from multilocus sequence typing data." J. Bacteriol. 86: 1518-1530.

Ferron (1989). "Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine." 13ème édition, Ed. C. et R.: 290-293.

Fitch B.R., Satchell K.L., Wilder S.R., Burg M.A., D.W. Lacher, Khalife W.T., Whittam T.S., and Young V.B. (2005). "Genetic diversity of *Campylobacter* sp. isolates from retail chicken products and humans with gastroenteritis in central Michigan." J. Clin. Microbiol. 43: 4221-4224.

Friedman C.R., Neimann J., Wegener H.C., and Tauxe R.V. (2000). "Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in United States and other industrialized nations. p. 121-138. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed), *Campylobacter*." 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Friedman S.M., Lu T., and Drlica K. (2001). "Mutations in DNA gyrase A gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region." Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2378-2380.

Froelich-Ammon and Osheroff N. (1995). "Topoisomerase poison: harnessing the dark side of enzyme mechanism." J. Biol. Chem. 270: 21429-21432.

Gaudreau C., Gilbert H. (1997). "Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *Campylobacter coli*." J. Antimicrob. Chemother. 39: 707-712.

- Ge B., Bodei S., Walker R., White D., Zhao S., McDermott P., Meng J. (2002). "Comparison of Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*." J. Antimicrob. Chemother. 50: 487-494.
- Ge B., McDermott P.F., White D.G., and Meng J. (2005). "Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*." Antimicrob. Agents Chemother. 49: 3347-3354.
- Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M.H., and Nash H.A. (1976). "DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3872-6.
- Gibreel A., Sjögren E., Kaijser B., Wretling B., and Sköld O. (1998). "Rapid emergence of high-level resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* associated with mutational changes in *gyrA* and *parC*." Antimicrob. Agents Chemother. 42: 3276-3278.
- Griggs D.J., Johnson M.M., Frost J.A, Humphrey T., Jorgensen F., and Piddock L.J.V. (2005). "Incidence and mechanism of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter spp.* isolated from commercial poultry flocks in the United Kingdom before, during, and after fluoroquinolone treatment." Antimicrob. Agents Chemother. 49: 699-707.
- Hakanen A., Jalava J., Kotilainen P., Jousimies-Somer H., Siitonen A., and Huovinen P. (2002). "*gyrA* polymorphism in *Campylobacter jejuni*: detection of *gyrA* mutations in 162 *C. jejuni* isolates by single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing." Antimicrob. Agents Chemother. 46: 2644-2647.
- Hanninen M.L., Perko-Makela P., Pitkala A., and Rautelin H. (2000). "A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area." J. Clin. Microbiol. 38: 1998-2000.
- Hiasa H., DiGate R. J., and Marians K.J. (1994). "to find." J. Biol. Chem. 269: 2093-2099.
- Hiasa, H. and Marian K.J. (1996). "Two distinct modes of strand unlinking during  $\theta$ -type DNA replication." J. Biol. Chem. 271: 21529-21539.
- Hopper D. C. (1999). "Mechanisms of fluoroquinolone resistance." Drug Resistance Updates 2: 38-55.
- Jeong J.Y., Yoon H.J., Kim E.S., Lee Y., Choi S.H., Kim N.J., Woo J.H., and Kim Y.S. (2005). "Detection of *qnr* in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea." Antimicrob. Agents Chemother. 49: 2522-2524.
- Jolley K.A., Feil E.J., Chan M.S., and Maiden M.C. (2001). "Sequence type analysis and recombinational tests (START)." Bioinformatics. 17: 1230-1231.
- Kampranis S.C., Bates A.D. and Maxwell A. (1999). "A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8414-8419.

- Kampranis S.C., and Maxwell A. (1996). "Conversion of DNA gyrase into conventional type II topoisomerase." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14416-14421.
- Karlyshev A.V., and Wren B.W. (2001). "Detection and initial characterization of novel capsular polysaccharide among diverse *C. jejuni* strains using Alcian blue Dye." J. Clin. Microbiol. 39: 279-284.
- Kato N., Ohta M., Kido N., Ito H., Naito S., Hasegawa T., Watabe T. and Sasaki K. (1990). "Crystallisation of R-form lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* and *E. coli*." J. Bact. 172: 1516-28.
- Keegan K.S.Mc, Borges-Warmsley M.I., and Walmsley A.R. (2002). "Microbial and viral drug resistance mechanisms." Trends in Microbiology 10: s8-s14.
- Khodursky A.B., Peter B.J., Schmid M.B., DeRisi J., Botstein D., Brown P.O, and Cozzarelli N.R. (2000). "Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 9419-24.
- Kido N., Ohta M., and Kato N. (1990). "Detection of lipopolysaccharides by ethidium Bromide staining after Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis." J. Bact. 172:1145-47.
- Kinana A.D., Cardinale E., Bahsoun I., Tall F., Sire J.M., Garin B., Boye C.S.B., Dromigny J.A and Perrier-Gros-Claude J.D. (2006). "Analysis of topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant and susceptible *Campylobacter jejuni* Strains Isolated in Senegal." *In press.* Int J. Antimicrob. Agents (IJAA-D-06-00157).
- Kinana A.D., Cardinale E., Bahsoun I., Tall F., Sire J.M., Garin B., Breurec S., Boye C.S.B., and Perrier-Gros-Claude J.D. (2006). "*Campylobacter coli*: diversity, genetic exchanges with *Campylobacter jejuni* and quinolone resistance." *In press.* Microbiological research (MICRES-D-06-00152).
- Kinana A.D., Cardinale E., Tall F., Bahsoun I., Sire J.M., Garin B., Breurec S., Boye C.S.B., and Perrier-Gros-Claude J.D. (2006). "Genetic Diversity and Quinolone Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry in Senegal." Appl. Environ. Microbiol. 72:3309-3313.
- Luo, N., O. Sahin, J. Lin, L. O. Michel, and Q. Zhang. (2003). "In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump." Antimicrob. Agents Chemother. 47: 390-394.
- Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russel J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., and Spratt B. (1998). "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3140-3145.
- Manning G., Dowson C.G., Bagnall M.C., Ahmed I.H., West M., and Newell D.G. (2003). "Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*." Appl. Environ. Microbiol. 69: 6370-6379.

Meads P.S., Slutsker L., Dietz V., Caig L.F.Mc, Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M. and Tauxe R.V. (1999). "Food-related illness and death in the United States." Emerg. Infect. Dis. 5: 607-625.

Mégraud F., Gavinet A.M. (1989). "L'infection à *Campylobacter* de l'enfant hospitalisé." Ann. Pédiatr. 36: 97-100.

Moore J.E., Corcoran D., James S.G., Dooley J.S.G., Fanning S., Lucey B., Matsuda M., Dowell D.A.Mc., Mégraud F., Millar B.C., O'Mahony R., O'Riordan L., O'Rourke M., Rao J.R., Rooney P.J., Sails A., Whyte P. (2005). "*Campylobacter*." Vet. Res. 36: 351-382.

Moore J.E., Matsuda M. (2002). "The history of *Campylobacter*: taxonomy and nomenclature." Irish Vet. J. 10: 495-501.

Moore J.E., O' Riordan L., Wareing D.R., Doyle R., Lanser J., Stanley T., Matsuda M., Matsui T., and Murphy P.G. (2003). "Phenotypic and genotypic relationship between *Campylobacter* spp. isolated from humans and chickens in Northern Ireland-a comparison of three phenotyping and two genotyping schemes." Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 211-216.

Moran A. P., Rietschel E. T., Kosunen T. U., and Zahringer U. (1991). "Chemical characterization of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides containing N-Acetylneuraminic acid and 2,3-Diamino-2,3-Dideoxy-D-glucose." J. Bact. 173: 618-626

Nachamkim I., Engberg J., Aarestrup F. (2000). "Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, in: Nachamkim I., Blaser MJ. (Eds), *Campylobacter*." American Society for Microbiology Press, Washington, DC: pp. 45-66.

Nikaido H. (1998). "The role of the outer membran and efflux pumps in the resistance of Gram-negative bacteria. Can we improve drug access." Drug Resistance Updates 1: 93-98.

Nikaido H. (2001). "Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria." Cell. Devel. Biol. 12: 215-223.

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

O'Halloran F., Lucey B., Cryan B., Buckley T, Fanning S. (2004). Molecular characterization of class 1 integrons from Irish thermophilic *Campylobacter*. J. Antimicrob. Chemother. 53: 952-7.

Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chinlillingworth T., Davies R.M, Feltwell T., Holroyd S, Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallens M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M-A, Rutherford K.M., Van Vliet A.H.M., Whitehead S., and Barrell B.G. (2000). " The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences." Nature 403: 665-668.

Payot S., Cloeckaert A. and Chaslus-Dancla E. (2002). "Selection and characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Campylobacter jejuni* using enrofloxacin." Microb. Drug Resist. 8: 335-343.

- Pezzotti G., Serafin A., Luzzi I., Mioni R., Milan M., Perin R. (2003). "Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in animals and meat in Northeastern Italy." Int. J. Food Microbiol. 82: 281-287.
- Piddock L.J.V., Ricci V., Pumbwe L., Everett M.J., and J.Griggs D. (2003). "Fluoroquinolones resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes." J. Antimicrob. Chemother. 51: 19-26.
- Putnam S, Frenck R., Riddle M., El-Gendy A., Taha N., Pittner B., Abu-Elyazeed R., Wierzba T., Rao M., Savarino S., Clemens J. (2003). "Antimicrobial susceptibility trends in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from a rural Egyptian pediatric population with diarrhea." Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47: 601-608.
- Rao M.R., Naficy A.B., Savarino S.J., Abu-Elyazeed R., Wierzba T.F., Peruski L.F., et al. (2001). "Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children." Am. J. Epidemiol. 154: 166-173.
- Rautelin H., Vierikko A., Hanninen M., Vaara M. (2002). "Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from Finnish subjects infected domestically or from those infected abroad." Antimicrob. Agents Chemother. 47: 102-105.
- Recchia G.D., Hall R.M. (1995). "Gene cassettes: a new class of mobile element." Microbiology 141: 3015-3027.
- Reece R.J. and Maxwell A. (1991). "DNA gyrase: structure and function." Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol. 26: 335-375.
- Rosa J., Sanchez-Delbarrio J.C., Messeguer X., and Rozas R.. (2003). "DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods." Bioinformatics. 19: 2496-2497.
- Rowe-Magnus D.A., Guerout A.M., Mazel D. (2002). "Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes." Mol. Microbiol. 43: 1657-1669.
- Rozen S., Skaletsky H. (2000). "*Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.* In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.*" Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.  
[http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)
- Ruiz, J. (2003). "Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection." J. Antimicrob. Chemother. 51: 1109-1117.
- Salazar-Lindo (1986). "Early treatment with erythromycin of *Campylobacter*-associated dysentery in children." J. Pediatr. 109: 355-360.
- Schouls L.M., Reulen S., Duim B., Wagenaar J.A., Willems R.J.L., Dingle K.E., Colles F.M., and Van Embden J.D.A. (2003). "Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination." J. Clin. Microbiol. 41: 15-26.

- Shen L.L., Kohlbrenner W.E., Weigl D., Baranowski J. (1989). "Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase." J. Biol. Chem. 264: 2973-2978.
- Skirrow M. (1993). "*Campylobacter* bacteraemia in England and Wales, 1981-91." Epidemiol. Infect. 110: 567-573.
- SKirrow M. (1994). "Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria." J. Comp. Pathol. 111: 113-149.
- Skirrow M., Blaser M. (2000). "Clinical aspects of *Campylobacter* infections, in: Nachamkin I., Blaser M. (Eds), *Campylobacter*." American Society for Microbiology Press, Washington, DC: 69-88.
- Smith J.L. (1995). "Arthritis, Guillain-Barre syndrome, and other sequelae of *Campylobacter jejuni* enteritis." J. Food Protect. 58: 1153-1170.
- Sorvillo F.J., Lieb L.E., Waterman S.H. (1991). "Incidence of campylobacteriosis among patients with AIDS in Los Angeles County." J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 4: 598-602.
- Stuki U, Frey J., Nicolet J. and Burnens A.P. (1995). "Identification of *C. jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membran protein." J. Clin. Microbiol.: 855-859.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Research, 22:4673-4680. <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw.html>
- Tran J.H., and Jacoby G.A. (2002). "Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance." PNAS. 99: 5638-5642.
- Ullsperger C., and Cozzarelli N.R. (1996). "Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. 271: 31549-31555.
- Vandamme et De Ley. (1991). "Proposal for a new family, Campylobacteraceae." Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 451-455.
- Wang, J. C. (1971). "Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein." ω. J. Mol. Biol. 55: 523-533.
- Wang, J. C. (2002). "Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3: 430-40.
- Wang Y., Huang W.M., & Taylor D.E. (1993). "Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations." Antimicrob. Agents Chemother. 37: 457-463.
- Wegener H.C., Aarestrup F.M., Bogo Jensen L., Hammerum A.M., Bager F. (1999). "Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe." Emerg. Infect. Dis. 5: 329-335.

Willmott C. J., Maxwell A. (1993). "A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex." Antimicrob. Agents Chemother. 37: 126-127.

Zirnstein G., Li Y., Swaminathan B., and Angulo F. (1999). "Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis." J. Clin. Microbiol. 37: 3276-3280.

# ANNEXES

## Préparation des solutions de travail

### I. Réactifs d'électrophorèse horizontale

#### 1. Solution d'EDTA 0,5 M

- EDTA (Sigma) 23,25 g
- Eau distillée QSP 125 ml

Dissoudre sur agitateur magnétique. L'EDTA ne se dissout qu'à un pH voisin de 8.

Conserver la solution à la température ambiante.

#### 2. Tampon Tris-acide acétique-EDTA (T.A.E) 50X

- Tris base (Sigma) 24,2g
- Acide acétique (Prolabo) 5,71ml
- EDTA 0,5 M 10 ml
- Eau distillée QSP 100 ml

Dissoudre sur agitateur magnétique puis conserver la solution à +4°C.

### II. Réactifs d'extraction des LPS

#### 1. Solution de soude 2N

- Pastilles de NaOH (Prolabo) 10 g
- Eau distillées QSP 125 ml

Dissoudre sur agitateur magnétique puis conserver à température ambiante.

#### 2. Solution Tris base de lyse

- Tris base (Sigma) 0,6 g
- Eau distillée QSP 100 ml

Conserver à température ambiante

#### 3. Solution alcaline de lyse

- Solution Tris base 10 ml
- NaOH 2N 250 µl

A utiliser immédiatement (ne se conserve pas).



#### **4. Solution Tris-HCl 0,5 M à pH 8**

- Tris base (Sigma) 15,15 g
- Eau distillée QSP 250 ml

Ajuster le pH à 8 avec du HCl 2N

#### **5. Solution Tris-HCl 0,1 M à pH 8**

- Tris base (Sigma) 3,03 g
- Eau distillée QSP 250 ml

#### **6. Solution phénol-chloroforme-alcool isoamylique**

- faire fondre les cristaux de phénol au bain marie à 68°C ;
- Prélever 100 ml de ce phénol ;
- Ajouter 100 ml de Tris-Hcl 0,5M à pH8 ;
- Agiter 20 minutes sur agitateur magnétique ;
- Laisser reposer. Lorsque les deux phases sont séparées, éliminer la phase aqueuse supérieure avec une pipette ;
- A la phase phénolique, ajouter 100 ml de Tris-Hcl 0,1 M à pH 8 ;
- Agiter 20 minutes sur agitateur magnétique ;
- Laisser reposer, puis retirer la phase aqueuse supérieure ;
- Vérifier le pH de la phase phénolique avec du papier pH. Si le pH est supérieur à 7,8 le phénol est équilibré. Sinon, ajouter 10 ml de Tris-Hcl 0,1 M à pH 8 jusqu'à ce que la phase phénolique ait un pH supérieur à 7,8. ;
- Ajouter 96 ml de chloroforme et 4 ml d'alcool isoamylique ;
- Rajouter au mélange final 10 ml de Tris-Hcl 0,1 M à pH 8 ;
- Conserver le mélange à 4°C dans un flacon teinté et enveloppé par du papier aluminium,
- C'est la phase phénolique inférieure qui est utilisée lors de l'extraction.

#### **7. Solution d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2**

- acétate de sodium (Sigma) 30,75 g,
- eau distillée QSP 125 ml.

Le pH est ajusté à 5,2 avec de l'acide acétique

### **III. Réactifs d'électrophorèse verticale**

### **1. Tampon de résolution à pH 8,8**

- Tris base (Sigma)	18,17 g
- SDS (Sigma)	0,4 g
- eau distillée QSP	100 ml

### **2. Tampon de regroupement à pH 6,8**

- Tris base (Sigma)	12 g
- SDS (Sigma)	0,8 g
- eau distillée QSP	200 ml

Ajuster le pH avec du HCl concentré

### **3. Persulfate d'ammonium (APS) à 30%**

- APS (Sigma)	1,5 g
- eau distillée QSP	5 ml

Faire des aliquots de 100 µl et conserver à -80 C

### **4. Solution Tris-glycine 10X**

- Tris base (Sigma)	30,3 g
- Glycine (Prolabo)	144 g
- eau distillée QSP	1000 ml

### **5. Tampon de migration**

- solution Tris-glycine 10X	100 ml
- SDS 10%	10 ml
- eau distillée QSP	1000 ml

Ajuster le pH à 8,2 avec du HCl 12N

### **6. Tampon échantillon**

- Tris 1,5 M pH 6,8	2,68 ml
- Bétamercaptoéthanol	2,5 ml
- SDS	1,15 g
- glycérol pur	4 ml
- bleu de bromophénol à 1% dans l'eau	0,5 ml