UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCE SANTE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LYON

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par :

Hayette TARGANT

le 27 septembre 2010

L'îlot de multirésistance aux antibiotiques, *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) : variabilité, diffusion inter - espèces et implication dans la virulence.

Composition du Jury

Président du Jury :	Pr Angely Kodjo
Rapporteur :	Pr Marc Galimand
Rapporteur :	Pr Jean-François Guillot
Examinateur :	Dr Corinne Dorel
Directeur de thèse :	Dr Jean-Yves Madec

Thèse préparée à l'AFSSA Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCE SANTE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LYON

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par :

Hayette TARGANT

le 27 septembre 2010

L'îlot de multirésistance aux antibiotiques, *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) : variabilité, diffusion inter - espèces et implication dans la virulence.

Composition du Jury

Président du Jury :	Pr Angely Kodjo
Rapporteur :	Pr Marc Galimand
Rapporteur :	Pr Jean-François Guillot
Examinateur :	Dr Corinne Dorel
Directeur de thèse :	Dr Jean-Yves Madec

Thèse préparée à l'AFSSA Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes.

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à témoigner mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de participer à l'évaluation de mon travail de thèse.

A toute l'équipe Antibiorésistance et Virulence Bactérienne pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse tout au long de ces trois années de thèse, et notamment à Christiane, Cécile, Karine, Estelle et Marisa.

Merci également à Agnès, Véronique, Florence et mes anciennes collègues thésardes Claire et Laure pour leur gentillesse.

A mon directeur de thèse, Jean-Yves Madec, pour m'avoir encadré, orienté et aidé dans les moments difficiles.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de thèse.

A mes parents et toute ma famille pour l'affection qu'ils m'ont toujours témoignée et pour le soutien qu'ils ont su m'apporter. Que ce travail soit pour eux un témoignage de ma profonde reconnaissance et de toute mon affection.

Et bien sûr, à mon petit bout de chou, Aymen, pour tout le bonheur qu'il met dans ma vie.

En mémoire de Jade.

RESUME

RESUME : Les salmonelles sont l'une des premières causes d'infections bactériennes d'origine alimentaire. Depuis le début des années 1990, l'isolement de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques a considérablement accru avec l'émergence des souches épidémiques *Salmonella* Typhimurium DT104 qui sont, pour la majorité, résistantes à l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et les tétracyclines. Les gènes codant ces résistances sont regroupés sur un intégron complexe de classe 1 nommé In104, localisé lui-même sur un îlot génomique de 43 kb désigné *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1). Depuis sa première identification chez *S.* Typhimurium DT104, SGI1 a été identifié à travers le monde chez plusieurs sérovars de *Salmonella,* et plus récemment chez *Proteus mirabilis*. Chez ces souches, la multirésistance aux antibiotiques est liée, soit à l'îlot SGI1 dans sa forme initialement décrite, soit à des variants de SGI1 correspondant à la structure initiale de SGI1 comportant des modifications au niveau de l'intégron complexe In104. L'îlot génomique *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) représente une préoccupation importante car le phénotype de multirésistance qu'il confère aux souches bactériennes est souvent responsable d'échecs thérapeutiques pouvant entrainer des complications importantes, voire la mort. Dans ce contexte, le travail de thèse a été centré sur l'enjeu sanitaire majeur représenté par cette diffusion épidémique du clone *S.* Typhimurium au cours des années 1990 chez l'homme et les bovins.

Les travaux entrepris dans le cadre de la thèse ont eu, en premier lieu, l'objectif d'apprécier l'évolution moléculaire de SGI1 dix années après l'émergence de ces souches en élevage bovin, puis d'évaluer la diffusion de SGI1 chez des souches naturelles appartenant à d'autres genres bactériens que *Salmonella.* Il a ainsi été dressé un bilan de la multirésistance aux antibiotiques chez les souches de *S.* Typhimurium isolées de bovins malades en France de 2002 à 2007 et une recherche de la présence de SGI1, chez d'autres espèces bactériennes que *Salmonella*, et par sondage à partir de leurs phénotypes de résistance, a été mise en œuvre. Les résultats obtenus ont indiqué un faible pouvoir évolutif de SGI1 qui semble en contradiction avec les capacités moléculaires majeures de recombinaison et de transfert démontrées tant *in vitro* qu'*in vivo*. Les études menées ont toutefois permis la première description d'un nouveau variant, nommé SGI1-T, qui résulte d'une recombinaison intramoléculaire.

Le deuxième grand objectif de la thèse a été de contribuer à une meilleure connaissance du rôle que pourrait avoir SGI1 dans la virulence bactérienne. Une première stratégie de modélisation expérimentale (salmonellose systémique murine) a ainsi été conduite, qui visait à comparer le pouvoir virulent *in vivo* de souches isogéniques ne se distinguant que par la présence ou l'absence de SGI1. Une seconde approche a été également menée, qui a consisté en une évaluation du rôle de SGI1 dans la formation de biofilms, l'organisation en biofilms favorisant une meilleure colonisation bactérienne, qui peut constituer à son tour un élément d'efficacité du pouvoir virulent final. Les résultats obtenus ont confirmé le rôle positif de SGI1 dans la formation de biofilms, et plus généralement son implication dans la signalisation cellulaire du Quorum Sensing.

TITLE: The multidrug resistance island, *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1): variability, inter-species diffusion and implication in virulence.

ABSTRACT: *Salmonella* is a major cause of food-borne outbreaks. Since the early 1990s, isolation of multidrug-resistant *Salmonella* has increased with the emergence of epidemic *Salmonella* Typhimurium DT104 strains which are mostly resistant to ampicilin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracyclines. The genes coding these resistances are clustered on a complex class 1 integron (MDR region) located on a genomic island of 43 kb designated SGI1. Since its first identification in *S*. Typhimurium DT104, SGI1 has been identified worldwide in other *Salmonella* serotypes, and more recently in *Proteus mirabilis*. For these strains, multidrug resistance is conferred, either to the classical structure of SGI1, or to related variants of SGI1 corresponding to the initial structure of SGI1 with modification of the complexe integron In104. The *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) constitutes a great concern since it confers a multidrug resistance phenotype often responsible of therapeutic failures which may cause important complications, or even death. In this context, the work has been focused on the major health issue represented by the epidemic diffusion of the *Salmonella* Typhimurium clone in the course of 1990s in human and cattle.

As a first objective, the work allowed to appreciate the molecular evolution of SGI1 in the course of time and to assess the diffusion of SGI1 to other bacterial strains than *Salmonella* in natural conditions. Therefore, an overview of the multidrug resistance in *Salmonella* Typhimurium strains isolated from diseased cattle in France from 2002 to 2007 was carried out and a screening of natural strains from other bacterial species than *Salmonella* that may harbor SGI1 was undertaken. The results indicated weak molecular evolutions of SGI1, which seems in contradiction with the great capability of SGI1 to recombine and transfer, as attested *in vitro* as i*n vivo*. Nevertheless, this study allowed the first description of a new SGI1 variant, named SGI1-T, which is the result of intra-molecular recombination events.

Another second objective of the thesis was to contribute to a better knowledge of the role of SGI1 in bacterial virulence. A strategy of experimental modeling (murine systemic salmonellosis) was first set up to compare the levels of virulence conferred by isogenic strains differing only by the presence or the absence of SGI1. A second approach was also carried out to evaluate the role of SGI1 in biofilm formation. Indeed, the organization in biofilm facilitates bacterial colonization, which constitutes in turn an element of effectiveness of the final virulence. A positive role of SGI1 in biofilm formation was demonstrated in the framework of this study, and more generally, questions the role of SGI1 in the Quorum Sensing regulation system.

DISCIPLINE : microbiologie, biologie moléculaire, biochimie.

MOTS-CLES : *Salmonella*, SGI1, multirésistance aux antibiotiques, virulence, biofilm, quorum sensing, *S*. Typhimurium DT104

LABORATOIRE : AFSSA Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 7.

Table des matières

INTRODUCTION **1**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **7**

I. LES SALMONELLES. **9**

I.1 MICROBIOLOGIE. [1] 9

I.1.1 Nomenclature. *9*

I.1.2 Caractères biochimiques. *9*

I.1.3 Marqueurs épidémiologiques. *10*

I.2 PATHOGENICITE ET IMPACT ECONOMIQUE [2-4]. 12

I.2.1 Habitat et spécificité d'hôtes. *12*

I.2.2 Principales étapes des infections à Salmonella. *13*

I.2.3 Impact en santé public. *14*

I.2.4 Impact en santé animale. *17*

II. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES EN ELEVAGE.[5, 6] **19**

II.1 TYPES D'UTILISATION. 19

II.1.1 Utilisation thérapeutique. *19*

II.1.2 Utilisation zootechnique. *19*

II.2 PROBLEMES RENCONTRES : RISQUES POUR LA SANTE ANIMALE ET HUMAINE. 20

II.2.1 Risques pour la santé animale. *20*

II.2.2 Risques pour la santé humaine. *20*

II.3 LEGISLATION. 21

II.4 RESEAUX DE SURVEILLANCE DES SALMONELLES ET DE L'ANTIBIORESISTANCE. 22

III. MECANISMES D'ANTIBIORESISTANCES ET TRANSFERT DE GENES. **24**

III.1 RAPPELS : MODES D'ACTION DES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES. 24

III.1.1 Qu'est ce qu'un antibiotique ? *24*

III.1.1 La cellule bactérienne et sites d'action des antibiotiques. *24*

III.1.2 Inhibiteurs de la synthèse de la paroi. *25*

III.1.3 Substances altérant la membrane plasmique. *29*

III.1.4 Inhibiteurs de la synthèse protéique. *29*

III.1.5 Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques. *32*

III.1.6 Inhibiteurs de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique. *33*

III.2 RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES. 34

III.2 1 Qu'est ce que la résistance aux antibiotiques ?[8, 9] *34*

III.2.2 La résistance intrinsèque : exemples de mécanismes. *35*

III.2.3 La résistance acquise : exemples de mécanismes.[10] *37*

III.2.3.1 Enzymes inactivantes. *37*

III.2.3.2 Modifications des cibles des antibactériens. *38*
III.2.3.3 Diminution de l'accumulation cellulaire des antibactériens. *38*
III.2.3.4 Développement d'une voie enzymatique alternative. *39*
III.3 TRANSFERTS DES GENES DE RESISTANCE. 39
III.3.1 Mécanismes de transfert de gènes. *40*
III.3.2 Eléments génétiques mobiles.[9, 12, 13] *47*
III.3.3 Pression de sélection et co-transfert. *53*
IV. SALMONELLA GENOMIC ISLAND (SGI1). **55**
IV.1 HISTORIQUE [23]. 55
IV.2 STRUCTURE DE SGI1. [32, 33] 56
IV.2.1 Organisation génétique globale de SGI1. ..... *56*
IV.2.2 L'intégron In104. ..... *57*
IV.2.3 Origine moléculaire de SGI1 ..... *58*
IV.3 EVOLUTION MOLECULAIRE DE SGI1. 60
IV.4 MOBILITE DE SGI1 62
IV.4.1 SGI1 : un élément mobile intégratif (IME) *62*
IV.4.2 Second site d'intégration de SGI1 et formation d'aires de tandem SGI1. ..... *63*
IV.5 PROBLEMES POSES PAR SGI1 65
IV.6 IMPLICATION DE SGI1 DANS LA VIRULENCE. 66
V. LES BIOFILMS BACTERIENS. **69**
V.1 DEFINITION. 69
V.2 CYCLE DE DEVELOPPEMENT. 69
V.2.1 Les étapes de formation du biofilm [89-91]. *69*
V.2.2 Eléments impliqués dans le développement des biofilms.[92] *71*
V.3 L'ARCHITECTURE DES BIOFILMS. 74
V.4 HETEROGENEITE DU BIOFILM [94, 95]. 75
V.4.1 Hétérogénéité de la composition chimique du biofilm. *75*
V.4.2 Hétérogénéité de l'état physiologique des cellules. *76*
V.4.3 Hétérogénéité de leurs bagages génétiques. *79*
V.5 GENETIQUE DU BIOFILM : RESEAUX DE REGULATION. 80
V.5.1 Le Quorum Sensing [98, 99] *80*
V.5.2 Les messagers secondaires et réseaux de protéines.[92] *85*
V.6 BIOFILM ET VIRULENCE. 87
V.6.1 Les biofilms : problèmes posés. *87*
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE **89**
RESULTATS **93**

VI. EVOLUTION MOLECULAIRE DE L'ILOT GENOMIQUE SGI1 : BILAN DE LA MULTIRESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ LES SOUCHES DE SALMONELLA TYPHIMURIUM ISOLEES DE BOVINS MALADES EN FRANCE DE 2002 A 2007. 95

VI.1 PROFILS DE MULTIRESISTANCE OBSERVES. 95

VI.2 DETECTION DE SGI1 ET CARACTERISATION DES GENES IMPLIQUES DANS LES PROFILS DE MULTIRESISTANCE. 96

VI.2.1 Détection de SGI1 96

VI.2.2 Caractérisation des gènes de résistances. 98

VI.3 RELATION ENTRE SGI1, LE PHAGE TYPE ET LE PROFIL PFGE. 101

VII. DIFFUSION INTER-ESPECE DE SGI1 : RECHERCHE CHEZ D'AUTRES GENRES QUE SALMONELLA.. 105

VIII. CARACTERISATION D'UN NOUVEAU VARIANT DE SALMONELLA GENOMIC ISLAND I, SGI1-T, CHEZ SALMONELLA TYPHIMURIUM. 107

VIII.1 DETECTION DE SGI1 107

VIII.2 CARACTERISATION DE L'ORGANISATION GENETIQUE DE L'INTEGRON IN104. 108

IX. CARACTERISATION D'UN GENE DE RESISTANCE AU FLORFENICOL CHEZ PASTEURELLA TREHALOSI. 113

IX.1 CONTEXTE DE L'ETUDE 113

IX.2 IDENTIFICATION DU PLASMIDE PCCK13698 114

IX.3 STRUCTURE ET ORGANISATION DU PLASMIDE PCKK13698. 116

IX.4 SITES D'INTEGRATION ET DE RECOMBINAISON DU PLASMIDE PCCK13698 118

IX.5 UTILISATION DU FLORFENICOL ET PRESSION DE SELECTION. 120

X. CONSTRUCTION DES SOUCHES UTILISEES POUR DETERMINER LE ROLE DE SGI1 DANS LA VIRULENCE ET LA FORMATION DE BIOFILM. 121

X.1 MODIFICATION DU PLASMIDE RED HELPER PKD46. 122

X.2 DELETION DE SGI1 DE LA SOUCHE S.TYPHIMURIUM 1948SA96. 125

X.2.1 Transformation de la souche Salmonella 1948Sa96 avec le plasmide Red Helper pKD46-Gm. 125

X.2.2 Préparation du produit PCR à électroporer. 126

X.2.3 Electroporation des souches S.Typhimurium 1948Sa96 pKD46-Gm avec le produit PCR. 126

X.2.4 Vérification de la construction par PCR. 128

X.3 ADDITION DE SGI1 : CONJUGAISON ET RECOMBINAISON MOLECULAIRE. 128

X.4 VERIFICATION DES SOUCHES TESTEES. 129

XI. ROLE DE SALMONELLA GENOMIC ISLAND 1 DANS LA VIRULENCE. 133

XI.1 DETERMINATION DE LA DOSE D'INOCULATION ET DU DELAI POST-INOCULATION POUR ETRE AU PIC D'INFECTION CHEZ DES SOURIS BALBC INOCULEES PAR DES SOUCHES SALMONELLA TYPHIMURIUM. 133

XI.2 EVALUATION DU ROLE L'ILOT GENOMIQUE SGI-1 DE SALMONELLA TYPHIMURIUM DANS LA CAPACITE DE COLONISATION DES RATES ET DANS LA LETALITE CHEZ LA SOURIS A L'AIDE DE MUTANTS ISOGENIQUES.... 134
XI.2.1 Trio S.Typhimurium DT104 1948Sa96, S.Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1 et S.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1. ..... *135*
XI.2.2 Couple S.Typhimurium 024217 et S.Typhimurium 024217 + SGI1. ..... *136*
XI.2.3 Couple S.Typhimurium 023277 et S.Typhimurium 023277 + SGI1 ..... *138*
XI.3 ANALYSE DES DONNEES. 139

XII. ROLE DE SALMONELLA GENOMIC ISLAND 1 DANS LA FORMATION DE BIOFILM..... 143

XII.1 ETUDE COMPARATIVE DES SOUCHES 1948SA96, 1948SA96ΔSGI1ET 1948SA96C2SGI1..... 143
XII.1.1 Vérification des souches testées. *144*
XII.1.2 Etude morphologique et test au calcofluor. *144*
XII.1.3 Mesure comparative des taux de biofilm produits. *146*
XII.1.4 Mesure comparative de la motilité. *150*
XII.2 ETUDE COMPARATIVE D'UN PANEL DIVERSIFIE DE SOUCHES ISOGENIQUES AVEC OU SANS SGI1..... 151
XII.2.1 Vérification des souches testées. *151*
XII.2.2 Etude morphologique et détection de la cellulose. *152*
XII.2.3 Evaluation du rôle de SGI1 dans la formation de biofilm. *154*
XII.2.4 Evaluation du rôle de SGI1 dans le quorum sensing. *157*
XII.3 ANALYSE DES DONNEES. 159

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 161

MATERIELS ET METHODES 171

XIII. TECHNIQUES GENERALES DE MICROBIOLOGIE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE. 173

XIII.1 TYPAGE DES SALMONELLES..... 173
XIII.2 DETERMINATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES..... 173
XIII.2.1 Méthode de diffusion en milieu gélosé. *173*
XIII.2.2 E-test. *175*
XIII.3 EXTRACTION D'ADN. 176
XIII.3.1 Extraction des ADN totaux. *176*
XIII.3.2.Extraction des ADN plasmidiques. *176*
XIII.4 POLYMERASE CHAIN REACTION..... 176
XIII.5 HYBRIDATION ADN-ADN : SOUTHERN BLOT. 178
XIII.6 EXPERIENCES DE CONJUGAISON..... 180
XIII.7 ELECTROPHORESE EN CHAMPS PULSES. 181
XIII.8 PREPARATION DE CELLULES COMPETENTES ET TRANSFORMATION..... 182
XIII.8.1Préparation de cellules compétentes. *182*
XIII.8.2 Transformation par choc thermique. *182*
XIII.8.3 Transformation par électroporation. *182*
XIII.9 TEST CALORIMETRIQUE CAT. 183

XIII.10 SÉQUENÇAGE DU PLASMIDE PCCK13698 184

XIV. TECHNIQUE DE MUTAGENESE 184

XIV.1 TECHNIQUE « ONE-STEP INACTIVATION OF CHROMOSOMAL GENE" 184
XIV.2 MODIFICATION DU PLASMIDE RED HELPER PKD46. 186

XV. MODELE MURIN DE SALMONELLOSE SYSTEMIQUE APPLIQUE AUX SOUCHES SALMONELLA TYPHIMURIUM 187

XV.1 DETERMINATION DE LA DOSE D'INOCULATION ET DU PIC D'INFECTION CHEZ DES SOURIS BALBC INOCULEES PAR DES SOUCHES DE SALMONELLA TYPHIMURIUM. 187
XV.2 SUIVI DE LA LETALITE ET MESURE DU TAUX DE COLONISATION DES RATES AU PIC D'INFECTION. 188

XVI. ETUDE DES BIOFILMS 189

XVI.3 MORPHOLOGIE DES COLONIES ET MIS EN EVIDENCE DE LA SYNTHESE DE CELLULOSE. 189
XVI.3.1 Etude de la morphologie des colonies. 189
XVI.3.2 Test au calcofluor. 189
XVI.4 ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILM EN PLAQUES 96 PUITS. 189
XVI.5 ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILM EN PLAQUES 24 PUITS. 190
XVI.6 DETECTION DU POLYSACCHARIDE CAPSULAIRE PAR LA METHODE ELLA. 191
XVI.7 ETUDE DE LA MOTILITE 192

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 193

ANNEXES 203

LISTE DES VARIANTS SGI1 205
LISTE DES COMMUNICATIONS. 209
ARTICLES PUBLIES ET SOUMIS. 210

Table des illustrations

FIGURE 1 : PRINCIPALES ETAPES DES INFECTIONS A SALMONELLA. 14
FIGURE 2 : LA CELLULE BACTERIENNE ET SITES D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES 24
FIGURE 3 : STRUCTURE DU PEPTIDOGLYCANE 26
FIGURE 4 : SYNTHESE DE LA PAROI BACTERIENNE ET SITES D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES. 26
FIGURE 5 : LES PENICILLINES 27
FIGURE 6 : STRUCTURE DE LA CEFOTAXIME ET DE LA CEFTAZIDIME, DES CEPHALOSPORINES DE TROISIEME GENERATION. 28
FIGURE 7 : LA SYNTHESE PROTEIQUE ET LES SITES D'ACTIONS DES ANTIBIOTIQUES 29
FIGURE 8 : STRUCTURE DE LA STREPTOMYCINE 30
FIGURE 9 : STRUCTURE DE LA TETRACYCLINE. 31
FIGURE 10 : STRUCTURE DU CHLORAMPHENICOL ET DU FLORFENICOL. 32
FIGURE 11 : SYNTHESE DE L'ACIDE TETRAHYDROFOLIQUE ET SITES D'ACTIONS DES ANTIBIOTIQUES. 33
FIGURE 12 : STRUCTURE DE L'ACIDE PARA-AMINOBENZOÏQUE (PABA) ET D'UN SULFAMIDE (SULFANILAMIDE). 34
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PAROIS BACTERIENNES DES BACTERIES GRAM + ET GRAM – 36
FIGURE 14 : PRINCIPAUX MECANISMES DE RESISTANCES ACQUISES AUX ANTIBIOTIQUES. 37
FIGURE 15 : LA TRANSFORMATION 41
FIGURE 16 : CYCLE DU BACTERIOPHAGE. 42
FIGURE 17 : LA TRANSDUCTION GENERALISEE. 43
FIGURE 18 : LA TRANSDUCTION LOCALISEE. 44
FIGURE 19 : CONJUGAISON DU FACTEUR F LIBRE. 45
FIGURE 20 : CONJUGAISON A PARTIR D'UNE SOUCHE HFR. 46
FIGURE 21 : LA F-DUCTION. 47
FIGURE 22 : STRUCTURE PLASMIDIQUE. 49
FIGURE 23 : EXEMPLE DE TRANSPOSONS 51
FIGURE 24 : INTEGRON ET MECANISME DE RECOMBINAISON. 53
FIGURE 25 : STRUCTURE GENETIQUE DE SGI1 57
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DE L'INTEGRON COMPLEXE IN104 58
FIGURE 27 : QUELQUES EXEMPLES DE VARIANTS SGI1. 61
FIGURE 28 : SGI1, UN ELEMENT MOBILISABLE INTEGRATIF. 63
FIGURE 29 : AIRES DE TANDEM DE SGI1.. 64
FIGURE 30 : LES ETAPES DE FORMATION DE BIOFILM. 71
FIGURE 31 : DEUX TYPES DE BIOFILMS. 74
FIGURE 32 : HETEROGENEITE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DU BIOFILM. 76
FIGURE 33 : HETEROGENEITE PHYSIOLOGIQUE DU BIOFILM. 77
FIGURE 34 : HETEROGENEITE GENETIQUE AU SEIN DU BIOFILM. 79

FIGURE 35 : QUORUM SENSING, SYSTEME AIP. 81
FIGURE 36 : QUORUM SENSING, SYSTEME LUXI/LUXR 82
FIGURE 37 : QUORUM SENSING, SYSTEME LUXPQ/LUXS 82
FIGURE 38 : QUORUM SENSING, LE SYSTEME AI-3/EPINEPHRINE/NOREPINEPHRINE. 83
FIGURE 39 : LE SYSTEME SDIA DE *SALMONELLA*..... 84
FIGURE 40 : LE SYSTEME LUXS/AI-2 CHEZ *SALMONELLA*. 85
FIGURE 41 : ROLE DU C-DI-GMP. 86

Principales Abréviations.

A……...Ampicilline-amoxicilline

ADN……..Acide desoxyribonucléique

AHL……N-acylhomosérine lactone

AI…….. Autoinducer **(**auto-inducteur)

AIP…….. Autoinducer polypeptide (polypeptide auto-inducteur)

ARN…….Acide ribonucléique

BHI……Brain heart infusion **(**bouillon cœur cervelle)

C……. Chloramphénicol-florfenicol

c-di-GMP…….. Cyclic diguanylate

CFU…… Colonies formant unité

CMI……..Concentration minimale inhibitrice

CTn……...Conjugative transposon **(**transposon conjugatif)

C3G……...Céphalosporine de troisième génération

DNTP……...Desoxyribonucléoside triphosphate

DO……...Densité optique

DR……..……Direct repeat **(r**épétition directe)

ELLA……... Enzyme-linked lectinsorbent assay

EPS…… Extracellular polymeric substance **(s**ubstance polymérique extracellulaire)

FRT…….. FLP recognition target (cible de reconnaissance des FLP)

ICE……..……. **I**ntegrative conjugative element (élément intégratif conjugatif)

IR…… inverted repeat (répétition inversée)

IS……Insertion sequence (séquence d'insertion)

LB……. Luria Broth

LPS……..... Lipopolysaccharide

MDR region……. Multi-drug resistance region (région de multi-résistance aux antibiotiques)

MDT…….. MultiDrug Tolérance (Tolérance aux antibiotiques)

ORF……... Open reading frame (phase ouverte de lecture)

Pb…….. paire de bases

PCR……... Polymerase chain reaction

PFGE……Pulse field gel electrophoresis (electrophorèse en champs pulsés)

Rpm……. Rotation par minute

S…….. Streptomycine-spectinomycine

Su…….....Sulfamide

T……....Tétracycline

TSA……...……Tryptone soya agar (agar tryptone soja)

TSB……... Tryptone soya broth (bouillon tryptone soja)

TIAC…… Toxi-infections alimentaires collectives

UTP/dUTP…….Uracyl triphosphate/desoxyuracyltriphosphate

INTRODUCTION

La sécurité sanitaire des aliments est un enjeu majeur de santé publique pour tous les pays. Les dangers des microorganismes sont connus depuis des décennies et ont mené à l'adoption de mesures préventives garantissant la sécurité alimentaire des populations. Ainsi, le risque de transmission par le lait, de la tuberculose et des salmonelloses, découvert au début du vingtième siècle, a conduit à l'adoption des systèmes de pasteurisation qui constituent une des premières mesures de lutte contre les dangers d'origine alimentaire. Dans de nombreux pays, des progrès importants ont été accomplis en terme de connaissance scientifiques des pathogènes et des techniques agricoles et industrielles impliquées dans les processus alimentaires. Malgré cela, des millions de personnes développent chaque année des pathologies suite à la consommation d'aliments contaminés, et le développement de la mondialisation du commerce des aliments a eu pour conséquence de créer les conditions nécessaires à l'extension des épidémies. En outre, le renforcement de la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue un problème majeur qui aggrave la situation présente. Ce phénomène s'est accentué durant les dernières décennies, principalement en raison de l'utilisation massive des antibiotiques et nécessite sans cesse la recherche et la production de nouvelles molécules à effet antibactérien.

L'utilisation des antibiotiques en milieu vétérinaire est très réglementée mais reste encore trop importante pour éviter la dissémination des gènes de résistance. Depuis le début des années 1990, l'isolement de souches de salmonelles multi-résistantes s'est considérablement accru avec l'émergence des souches épidémiques du genre S*almonella* sérovar Typhimurium et lysotype DT104. Les souches du lysotype DT104 présentent, en général, un phénotype comprenant des résistances à des antibiotiques appartenant à cinq familles différentes incluant l'ampicilline (β-lactamines), le chloramphénicol et le florfénicol (phénicolés), la streptomycine et la spectinomycine (aminosides), les sulfamides et les tétracyclines. Ces gènes de résistance sont situés sur un **locus de multirésistance** de 12.5 kb **(In104)** qui est un intégron complexe de type 1, lui-même situé sur un îlot génomique de 43 kb appelé ***Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1).**

Plusieurs éléments scientifiques attestent de l'évolution permanente de SGI1 qui résulte de l'acquisition de nouveaux déterminants génétiques ou, au contraire, à la perte de séquences. Chez *Salmonella*, de nombreux variants de SGI1 ont été décrits à travers le monde. Ils résultent de phénomènes d'insertions, de délétions, de recombinaisons intra ou inter moléculaires ainsi que de transpositions intramoléculaires au niveau du locus de

multirésistance In104. Les différents variants de SGI1 présentent des phénotypes distincts ne comportant pas toujours la pentarésistance. Certains correspondent à des formes tronquées de SGI1 tandis que d'autres résultent de l'intégration de nouvelles séquences nucléotidiques incluant de nouveaux gènes de résistances (gentamicine, triméthoprime, …). Les salmonelles, qui appartiennent à la famille des entérobactéries, habitent le tractus gastro-intestinal qui constitue non seulement un lieu d'échange entre bactéries de diverses espèces mais aussi un lieu où se produit une pression de sélection importante causée par l'utilisation des antibiotiques. La politique thérapeutique en termes d'antibiotiques est importante en ce sens où elle va contribuer à la dissémination des gènes de résistances par le biais des phénomènes de sélection. L'intégron complexe In104 de SGI1 possédant un fort potentiel recombinatoire, il est envisageable qu'il intègre de nouveaux gènes de résistance correspondant aux antibiotiques actuellement utilisés en thérapeutique.

D'autre part, il a été démontré récemment que SGI1 est une structure mobile et plus précisément un élément mobilisable intégratif (IME). La description de SGI1 et de ses variants chez plusieurs sérovars de *Salmonella,* et plus récemment chez *Proteus,* suggère l'existence d'un transfert horizontal qui a été confirmé par des expériences *in vitro*. La capacité de mobilisation de SGI1 associé à son fort potentiel de recombinaison représente un risque important d'émergence de nouveaux pathogènes multi-résistants appartenant à d'autres espèces que *Salmonella*.

En outre, certaines études statistiques ont montré que la mortalité et la morbidité étaient plus importantes suite à des infections causées par des souches de *Salmonella* Typhimurium DT104 multi-résistantes en comparaison avec les infections causées par leurs homologues sensibles. Ce résultat suggérait une hypervirulence conférée par SGI1 qui n'a pas pu être confirmée par des études ultérieures. Le rôle de SGI1 dans la virulence reste donc ambiguë et la question qui se pose est de savoir si la mortalité accrue observée avec les souches du lysotype DT104 multi-résistantes est due à un phénotype d'hypervirulence conféré par SGI1 ou est simplement le fait d'échecs thérapeutiques. Une autre hypothèse a également été proposée et met en relation le succès épidémique des souches du sérovar DT104 avec une capacité accrue, conférée par SGI1, de s'organiser en biofilms. Cette propriété leur confèrerait une résistance accrue aux conditions environnementales entre deux épisodes infectieux, favorisant ainsi leurs disséminations.

Actuellement, aucune donnée ne permet de confirmer ces hypothèses et les déterminants de la virulence chez *Salmonella* Typhimurium DT104 restent mal connus à ce jour.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les salmonelles.

I.1 Microbiologie. [1]

I.1.1 Nomenclature.

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des Enterobacteriaceae qui sont des hôtes habituels du tube digestif. Sur la base de critères biochimiques, le genre *Salmonella* est subdivisé en deux espèces : *S. enterica* et *S. bongori*.
Sur la base de critères phénotypiques, l'espèce *S.enterica* est elle-même divisée en 6 sous-espèces (*enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houteanae et indica*).
D'un point de vue médical, seules les sous espèces *enterica, arizonae* et *diarizonae* sont intéressantes car les sous espèces *salamae* et *houteanae* sont plutôt spécifiques des reptiles et ne sont pas très répandues tandis que la sous-espèce *indica* est très rarement isolée.
La sérologie, basée sur la caractérisation des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H), permet de classer les sous-espèces en sérovars. On connaît actuellement environ 2500 sérovars qui sont répertoriés au sein du schéma de Kaufmann- White.

I.1.2 Caractères biochimiques.

Les salmonelles sont des bacilles gram négatif présentant les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae. Elles sont généralement mobiles, sans capsule, possèdent une nitrate réductase mais pas d'oxydase. Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz et poussent sur les milieux ordinaires.

Au sein de la famille des entérobactéries, les caractères permettant l'identification biochimique du genre *Salmonella* sont l'absence d'uréase et de tryptophane désaminase, l'absence de production d'indole et d'acétoïne, l'absence de fermentation du lactose, du saccharose, de l'inositol, de l'amygdaline, de l'adonitol et du 2-cétogluconate, la présence d'une thiosulfate réductase, la décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine et la capacité fréquente de croître sur milieu au citrate de Simmons.

Les deux espèces du genre *Salmonella* peuvent être différenciées par leurs caractères biochimiques : *Salmonella bongori* ne fermente pas le sorbitol et pousse sur un milieu contenant du KCN, contrairement à *Salmonella enterica.*

Les six sous-espèces de l'espèce *Salmonella enterica* peuvent également être identifiées par leurs caractères biochimiques (cf. Tableau 1).

	S.enterica						***S.bongori***
	Sous espèce						
Caractères biochimiques	***enterica***	***salamae***	***arizonae***	***diarizonae***	***houteanae***	***indica***	
ONPG	**-**	**-**	**+**	**+**	**-**	**variable**	**+**
Gelatinase	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**
Culture sur milieu + KCN	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**	**-**	**+**
Dulcitol (fermentation)	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**variable**	**+**
Malonate (utilisation)	**-**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**
Sorbitol (fermentation)	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**
-glucuronidase	**variable**	**variable**	**-**	**+**	**-**	**variable**	**-**
-glutamyl transferase	**variable**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
Lyse par le phage O1	**+**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**+**

Tableau 1 : Principaux caractères biochimiques des souches *S.enterica* et *S.bongori.*

I.1.3 Marqueurs épidémiologiques.

I.1.3.1 Sérotype.

L'identification des sérotypes selon le schéma de Kaufmann-White est fondée sur la formule antigénique. Comme toutes les entérobactéries, les salmonelles possèdent potentiellement trois types d'antigènes ayant un intérêt diagnostic. On distingue des antigènes somatiques (O), des antigènes flagellaires (H) et des antigènes de surface. Dans ce schéma, les antigènes O sont chiffrés de 1 à 67 et les antigènes H sont représentés par une lettre pour la phase 1 et un nombre ou une lettre pour la phase 2.

SEROVARS	ANTIGENES O	ANTIGENES H	
		Phase 1	Phase 2
Groupe B (O : 4)			
***S*.Typhimurium**	**1, 4, [5], 12**	**i**	**1, 2**
***S*.Saint-paul**	**1, 4, 12, 27**	**e, h**	**1, 2**
***S*.Agona**	**1, 4, 12**	**f, g, s**	**-**
***S*.Derby**	**1, 4, [5], 12**	**f, g**	**-**
***S*.Paratyphi B**	**1, 4, [5], 12**	**b**	**1, 2**
***S*.Schwarzengrund**	**1, 4, 12, 27**	**d**	**1,7**
Groupe D (O : 9)			
***S*.Dublin**	**1, 9, 12 [Vi]**	**g, p**	**-**
***S*.Enteritidis**	**1, 9, 12**	**g, m**	**-**
***S*.Typhi**	**9, 12 [Vi]**	**d**	**-**
***S*.Panama**	**1, 9, 12**	**l, v**	**1, 5**
Groupe C_1, C_2, C_3 (O : 6,7-6,8-8)			
***S*.Hadar**	**6, 8**	**r**	**e, n, x**
***S*.Newport**	**6, 8**	**e, h**	**1, 2**
***S*.Montevideo**	**6, 7**	**g, m, s**	**-**
***S*.Kentucky**	**8, 20**	**i**	**z_6**
***S*.Emek**	**8, 20**	**g, m, s**	**-**
***S*.Tennessee**	**6, 7, 14**	**z_{29}**	**-**
Groupe A			
***S*.Paratyphi A**	**1, 2, 12**	**a**	**-**

Tableau 2 : Caractères antigèniques des principales souches *S.enterica.*

- ***Les antigènes O : antigènes de paroi ou antigènes somatiques.***

Les antigènes O sont portés par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS) qui est un des constituants de la membrane externe de la paroi bactérienne. Ces chaînes polysaccharidiques sont des polymères de chaînons répétés et identiques pour un même sérovar. Les différences antigéniques des chaînes spécifiques sont liées, soit à la nature des sucres qui composent le chaînon répété, soit à leur mode de liaison.

La réaction des anticorps anti-O avec les colonies bactériennes correspondantes conduit à la formation d'une agglutination nettement visible à l'œil.

- ***Les antigènes flagellaires ou antigènes H.***

Les antigènes H sont portés par la flagelline qui est la protéine de structure des flagelles. La plupart des sérovars de salmonelles possèdent deux systèmes génétiques codant pour des flagellines différentes. Les flagelles existent alors sous deux formes antigéniques qualifiées de phase 1 et de phase 2 : les antigènes H sont diphasiques. Pour une cellule bactérienne donnée, un seul des deux gènes s'exprime et les flagelles seront soit en phase 1 soit en phase 2. Dans

une population bactérienne, on retrouve le plus souvent un mélange de cellules dont certaines expriment les antigènes flagellaires de la phase 1 et d'autres les antigènes correspondant à la phase 2 (cf. Tableau 2).
Pour une minorité de sérovars, la bactérie ne peut synthétiser qu'un seul type de flagelles : l'antigène H est alors monophasique.

La réaction des anticorps anti-H avec les bactéries correspondantes conduit à l'immobilisation des cellules.

- ***Les antigènes de capsule.***

Les antigènes de capsule, nommés Vi, n'ont été identifiés que chez trois sérovars : Typhi, Paratyphi C et Dublin. La présence de cet antigène peut induire un faux négatif lors de tests d'agglutinations pour la recherche des antigènes O. Pour permettre la réaction des sérums anti-O avec leurs antigènes correspondant, une étape préalable de chauffage pendant 10 minutes à 100°C est nécessaire.

I.1.3.2 Lysotype.

La lysotypie étudie la sensibilité des souches, ou leur résistance, à une série de bactériophages sélectionnés.

I.2 Pathogénicité et impact économique [2-4].

I.2.1 Habitat et spécificité d'hôtes.

Le réservoir des salmonelles est très large et inclue de nombreux animaux (mammifères, oiseaux, reptiles, poissons, insectes) mais le principal réservoir est constitué par l'intestin des Vertébrés. Elles sont aussi retrouvées dans l'environnement (sol, boues) dans lequel elles sont disséminées par les fèces. Elles peuvent y survivre pendant plusieurs mois si les conditions de température, de pH et d'humidité sont favorables.

Toutes les salmonelles sont considérées comme pathogènes. Néanmoins, sur la base de leur spécificité d'hôte, les salmonelles se distinguent en deux groupes.

■ Suivant les sérovars, les salmonelles peuvent présenter une spécificité étroite pour certaines espèces animales ou pour l'être humain. Dans ce cas, les infections sont sévères et on parle de salmonelloses primaires ou adaptées à l'hôte.

■ D'autres sérovars ne sont pas spécifiques de l'hôte et les infections en résultant sont beaucoup moins graves : on parle alors de salmonelloses secondaires ou gastro-intestinales.

Citons comme exemples *S*. Dublin spécifique des bovins, *S*. Abortusovis spécifique des moutons et *S*. Cholerae des porcs qui sont très pathogènes pour les espèces auxquelles ils sont adaptés mais causeront des infections moins sévères pour les humains.
Inversement, *S*. Typhi et *S*. Paratyphi A, B, C, spécifiques de l'être humain, peuvent être responsables de graves infections dites typhoïdiques chez l'homme mais auront des conséquences moins graves chez les animaux.
S.Typhimurium, Enteritidis, Montevideo, Panama, Saint-paul sont des salmonelles ubiquistes, sans spécificité d'hôtes, responsables de salmonelloses secondaires chez les animaux ou les humains.

I.2.2 Principales étapes des infections à Salmonella.

Les *Salmonella* font partie des bactéries entéropathogènes invasives. En cas d'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, elles parviennent au niveau de l'intestin grêle où elles se multiplient. Elles détruisent la bordure en brosse des cellules intestinales, puis pénètrent dans les cellules épithéliales par une invagination de la membrane. Les bactéries poursuivent leurs multiplications intracellulaires à l'intérieur de vacuoles. L'invasion intestinale par les salmonelles induit une réponse inflammatoire causant des ulcérations responsables de la sécrétion d'eau et d'électrolytes.

Lors de salmonellose typhoïdique, les bactéries arrivent au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques, puis se multiplient avant qu'une partie de la population bactérienne passe dans le courant lymphatique puis sanguin causant une infection systémique.

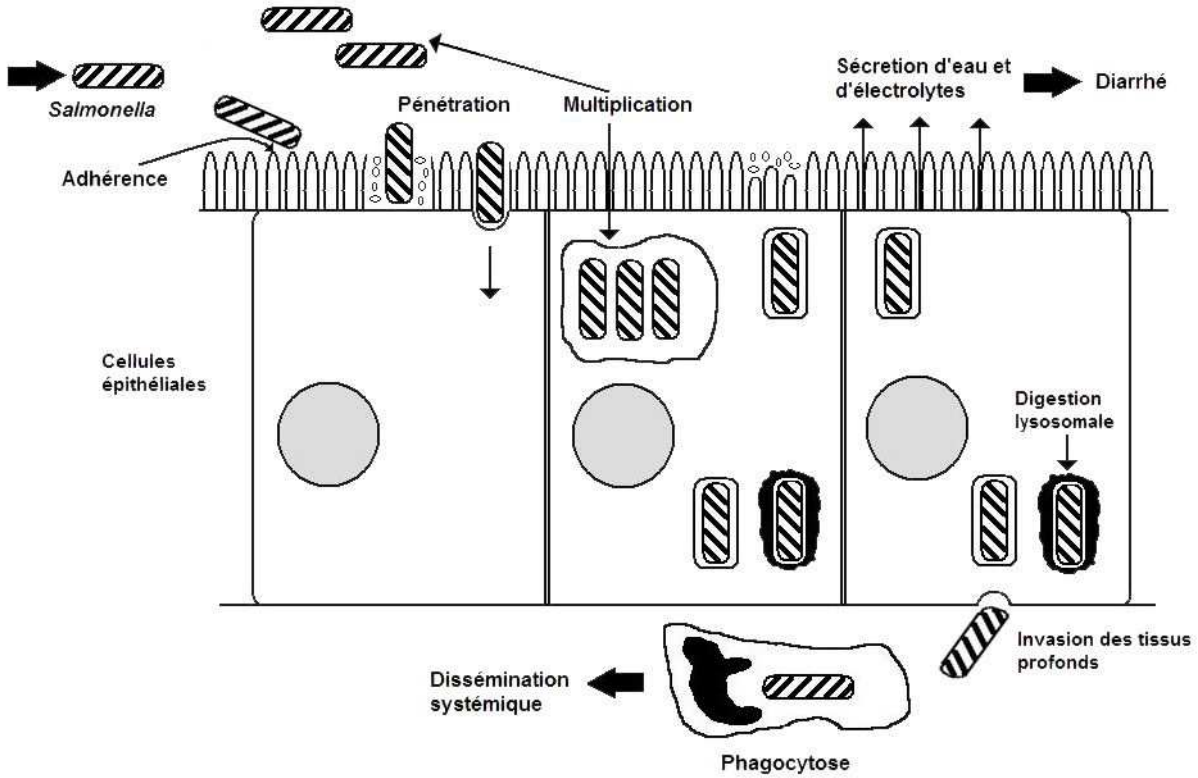


Figure 1 : Principales étapes des infections à Salmonella.

I.2.3 Impact en santé publique.

❖ Les toxi-infections alimentaires.

Les salmonelles sont l'une des premières causes d'infections bactériennes d'origine alimentaire.

Il existe 2500 sérotypes de *Salmonella* mais quelques unes seulement causent la majorité des infections humaines. La principale est *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis suivie de *Salmonella* sérovar Typhimurium dont la plus isolée chez les humains est le phage type DT104.

- Sources de contamination.

La contamination humaine se fait essentiellement par la consommation d'aliments contaminés (Charcuterie, viandes, œufs, produits laitiers, poissons…). Les animaux infectés excrètent des salmonelles par des pertes fécales. La contamination des carcasses par ces fèces est la principale source d'intoxication alimentaire.

Les salmonelles peuvent également être directement transmises dans les produits alimentaires. *S*. Enteritidis peut être trouvé dans les œufs tandis que d'autres sérovars peuvent être présents dans le lait.

Les catégories de produits pouvant représenter un danger en santé public sont donc :

- la viande crue ou mal cuite.
- les œufs et les produits contenant des œufs crus.
- le lait non pasteurisé et tout produit fabriqué à partir de lait non pasteurisé.

■ Symptômes.

Les toxi-infections alimentaires à salmonelles se manifestent par une gastro-entérite avec une fièvre de 39°C-40°C, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et un syndrome diarrhéique fait de selles liquides et fétides. L'évolution des infections est le plus souvent favorable en 3 à 5 jours mais varie selon l'âge, le statut immunitaire de l'hôte et la virulence du sérotype. Les salmonelloses entrainent parfois des bactériémies avec des localisations secondaires pour certaines bactéries à caractère invasif.

■ Quelques chiffres.

En France, l'estimation par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) pour la période 1995-1999 faisait état de 32000 à 43000 cas annuels confirmés entraînant de 6000 à 10700 hospitalisations avec 100 à 560 décès (InVS 2004). Selon l'institut Pasteur, entre 2001 et 2003, en France, 1656 toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) affectant 22 113 patients ont été déclarées.

Selon l' « Economic research service » (ERS), en 2008 aux Etats-Unis, les salmonelloses ont mené à 157 738 consultations, 14 487 hospitalisations et 415 décès. Le coût pour la collectivité est important puisque les dépenses engagées sont évaluées à 2.6 milliard de dollars (http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/).

Selon l' « European Food Safety Authority » (EFSA), en 2007, 155 540 cas de salmonelloses ont été rapportés via TESSy (The European Surveillance System) sur 30 pays européens.

Néanmoins, une diminution des cas de salmonelloses est observée depuis 2004. En 2004, on rapportait 196 025 cas, en 2005 173 879 et en 2006 164 011. Cette diminution peut s'expliquer par un contrôle plus important des salmonelles dans les populations animales ainsi qu'une meilleure hygiène au cours de la chaine alimentaire.

❖ Les fièvres typhoïde et paratyphoïde.

Les autres types d'affections causées par les salmonelles sont les fièvres typhoïde et paratyphoïde. (Du grec tuphos, torpeur)

■ Sources de contamination.

Les *Salmonella* Typhi et Paratyphi responsables de ces fièvres ont pour seul réservoir l'homme. La contamination se fait donc par ingestion d'eau ou d'aliments souillés par des selles d'origine humaine.

■ Symptômes.

Les symptômes se traduisent par une forte fièvre accompagnée de maux de tête, de douleurs abdominales (diarrhée, constipation), d'anorexie et d'abattement. Le malade reste dans un état de prostration pouvant aller jusqu'à la torpeur.
En cas de formes bénignes, l'état du malade restera stationnaire pendant quinze jours et la convalescence nécessitera une durée de plusieurs semaines. Dans les formes les plus graves, des complications peuvent survenir entrainant des ulcérations responsables d'hémorragies et de perforations digestives pouvant être fatales en l'absence de traitement.

■ Quelques chiffres.

Selon l'institut Pasteur, 20 millions de cas annuels de fièvre typhoïde et plus de 200 000 morts ont été comptabilisés (Données établies en 2000).
La maladie à transmission oro-fécale touche principalement les zones où l'hygiène est précaire. Dans les pays industrialisés, elle est peu fréquente mais n'a pas totalement disparu. Toujours selon l'institut Pasteur, en France, depuis 2003, 100 à 250 cas d'infections à

Salmonella Typhi ont été déclarées, la majorité ayant été contractées à l'étranger. L'incidence annuelle des cas en France est inférieure à 0.2 pou 100 000 habitants.

I.2.4 Impact en santé animale.

Outre le coût économique engendré par les toxi-infections humaines, les salmonelloses sont responsables d'une perte économique importante due à la perte de nombreux animaux atteints et aux frais engagés pour mettre en place les soins vétérinaires.

L'impact des salmonelloses se répercute à plusieurs niveaux de la production dans les filières animales. Les pertes économiques sont dues à :

- la mort des animaux.
- la baisse de production de lait.
- les avortements.
- le coût des traitements.
- les pertes dues au lait contaminé avec les antibiotiques.
- les pertes dues à l'attente nécessaire pour l'élimination des antibiotiques dans les organismes animaux.
- l'augmentation de travail due à la maladie des animaux.
- la réduction de l'efficacité de la nourriture pour la prise de poids.
- impossibilité de vendre un animal issu d'un troupeau malade.

■ Source de contamination.

Les animaux peuvent être infectés après contact avec d'autres animaux atteints de salmonellose qui excrètent des salmonelles dans leurs fèces. Ils peuvent également être infectés suite à une contamination de leurs nourritures ou de leurs environnements.

■ Symptômes.

Bovins : Chez les veaux, l'infection est aiguë et de forme septicémique. Les salmonelloses peuvent provoquer une fièvre élevée, des pneumonies, de l'arthrite et des entérites. La létalité est élevée. Chez les bovins adultes, la salmonellose correspond souvent à une infection secondaire qui s'ajoute à une autre maladie. Les symptômes sont une diarrhée abondante

mêlée de sang ainsi que de violentes douleurs intestinales. Des avortements peuvent subvenir chez les vaches gestantes.

Ovins : L'infection à *S.* Abortusovis provoque des avortements à partir du 4ème mois de gestation. *S.* arizonae O61 peut provoquer chez les moutons des avortements, des diarrhées ou une septicémie de forme bénigne.

Porcins : L'infection à *S.* Choleraesuis est septicémique et aiguë et peut provoquer une fièvre élevée, une cyanose, une pneumonie, une diarrhée et une létalité élevée.

Volailles : L'infection à *S.* Gallinarum provoque une salmonellose caractérisée par l'apathie des animaux et leurs refus de se nourrir ainsi qu'une mortalité élevée (des dizaines de pourcents en quelques semaines).

- Quelques chiffres.

Les conséquences des infections à salmonelles se répercutent à différents niveaux de la production animale, engendrant une perte économique considérable. Néanmoins, très peu de données existent et il est difficile de déterminer de quel ordre s'élèvent ces pertes économiques.

Au Danemark, les autorités ont mis en place depuis plusieurs années un programme de lutte contre les salmonelles dans la production d'animaux d'élevage, dont le coût annuel est évalué à 14,1 millions de dollars. On estime que ce programme permet au pays de réaliser une économie de 25,5 millions de dollars par an.

En 1977, une étude réalisée en Allemagne estime à environ 60 millions de dollars les pertes économiques dues aux salmonelloses dans les filières animales.

II. Utilisation des antibiotiques en élevage.[5, 6]

II.1 Types d'utilisation.

II.1.1 Utilisation thérapeutique.

En élevage de rente, les antibiotiques sont utilisés :

- **à but curatif**, pour éliminer les bactéries responsables d'infections chez les animaux atteints.
- **à but prophylactique**, pour prévenir contre une infection possible à l'occasion d'un transport, d'un stress.
- **A but métaphylactique,** pour prévenir contre la propagation d'une infection à un groupe d'animaux dont quelques individus sont malades. Une médication précoce permet de réduire la mortalité et le nombre d'animaux malades mais elle permet également de réduire la quantité d'antibiotique utilisée qui aurait pu être bien plus importante si l'infection s'était propagée.

L'administration des antibiotiques se fait par voie alimentaire qui est le moyen le plus simple, le plus rapide et qui permet de traiter un grand nombre d'animaux. L'antibiotique peut être incorporé dans l'eau de boisson ou dans les aliments. Notons également, que les substances utilisées à but thérapeutique appartiennent principalement aux mêmes classes d'antibiotiques que celles utilisées en médecine humaine

II.1.2 Utilisation zootechnique.

Lorsqu'on administre certains antibiotiques, à faible dose, aux animaux en période de croissance, on obtient une augmentation du gain de poids que l'on peut évaluer entre 2 à 5 % : c'est l'effet zootechnique. Ces antibiotiques constituent des facteurs de croissance dont l'utilisation est clairement définie dans des licences spécifiant l'animal ciblé, la dose et la durée d'administration.

L'effet zootechnique est d'autant plus important lorsque l'élevage est réalisé dans de mauvaises conditions d'hygiène. L'amélioration sanitaire des conditions d'élevage entraîne une diminution significative de l'effet zootechnique.

II.2 Problèmes rencontrés : risques pour la santé animale et humaine.

II.2.1 Risques pour la santé animale.

- Risque accru de contracter certaines infections.

Les antibiotiques agissent sur les voies intestinales et affaiblissent les défenses naturelles de l'animal. Ceci l'expose à contracter des infections qui, en temps normal, ne seraient pas survenues.

- L'échec thérapeutique.

L'utilisation des antibiotiques a pour conséquence de créer des environnements dans lesquels une pression de sélection va favoriser la survie des bactéries résistantes et, par voie de fait, la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques. L'appareil digestif animal constitue un véritable bioréacteur dans lequel va pouvoir s'opérer des échanges multiples de gènes conduisant quelquefois à l'apparition de nouveaux pathogènes multi-résistants. Les phénomènes de résistance aux antibiotiques sont responsables de nombreux échecs thérapeutiques liés au fait que les traitements sont souvent prescrits sans antibiogramme préalable.

II.2.2 Risques pour la santé humaine.

- Le risque toxique et allergique.

La persistance de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires peut provoquer des réactions allergiques.

- L'échec thérapeutique.

Des bactéries résistantes d'origine animale, pathogènes ou non, peuvent être directement transmises à l'homme par voie alimentaire entrainant soit une toxi-infection alimentaire soit, dans le cas des bactéries non pathogènes, une propagation des gènes de résistances aux bactéries commensales et infectieuses d'origine humaine. L'antibiothérapie chez l'homme peut s'avérer inefficace pour lutter contre des infections liées à des germes ayant acquis une ou plusieurs résistances aux antibiotiques.

En somme, le principal problème posé par l'utilisation des antibiotiques en élevage est la sélection des bactéries résistantes. La bactérie est un organisme au génome très flexible et très dynamique avec des capacités très importantes d'acquisition et de diffusion d'éléments génétiques. Les gènes de résistance aux antibiotiques sont transmis de manière horizontale entre bactéries de différentes espèces, et, plus rarement, entre bactéries provenant de différentes espèces animales. Il n'y pas d'étanchéité absolue dans le monde bactérien. Ceci conduit à une augmentation des échecs thérapeutiques et de la gravité des infections qui se manifestent par une prolongation de la durée de la maladie, par une plus grande fréquence de septicémies et d'hospitalisations ou un accroissement de la mortalité.

II.3 Législation.

L'utilisation des antibiotiques a permis une amélioration considérable de l'état sanitaire des populations humaines et animales et en l'absence d'alternatives prophylactiques et vaccinales, ils restent indispensables. Cependant, il est nécessaire de définir les conditions d'un usage raisonné de ces antibiotiques afin de limiter la dissémination des gènes de résistances.
Comme pour la médecine humaine, les antibiotiques utilisés chez les animaux sont soumis à une **autorisation de mise sur le marché** (AMM) délivrée par l'Agence nationale du Médicament vétérinaire et/ou par l'Agence Européenne du médicament.
Le comité des médicaments vétérinaires de l'agence européenne du médicament révise régulièrement les données requises concernant les risques potentiels liés à l'antibiotique pour l'animal et la santé publique.

Outre l'AMM, la législation impose un **délai d'attente** entre la dernière administration d'un antibiotique à l'animal et la mise en vente de cet animal ou de ses productions (lait, œuf) afin qu'aucun résidu ne se retrouve dans les tissus animaux ou dans ses productions. Cette mesure garantit la protection des consommateurs.

En 1992, la législation européenne a défini les **limites maximales de résidus** (LMR) qui sont la limite maximale de résidus antibiotiques acceptable dans les carcasses à l'abattage et pour laquelle aucun effet nocif pour la santé public n'a été observé. Depuis le 1er janvier 1997, tous les antibiotiques, pour lesquelles aucune LMR n'était acceptable, ont été retirés du marché incluant le chloramphénicol et le nitro-imidazole.

Afin d'éviter la propagation des gènes de résistance entre l'homme et l'animal, la politique principale est d'éviter l'utilisation d'antibiotiques communs en médecine vétérinaire et humaine. Ainsi, en Europe, l'utilisation des β-lactamines et des tétracyclines comme facteurs de croissance a été interdite dès 1975. Dès 1999, seules quatre molécules étaient utilisables en tant qu'additif ou facteurs de croissance dont deux anticoccidiens et deux antibiotiques : l'avilamycine et le flavophospholipol qui sont totalement différentes en termes de structure ou d'activité avec les antibiotiques utilisés en médecine humaine.

Récemment, la Commission européenne a présenté des propositions interdisant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance. Le nouveau règlement proposé prévoit l'élimination progressive, à partir de Janvier 2006, des quatre additifs antibiotiques encore présents sur le marché de l'UE.

De plus, certains antibiotiques développés ou en cours de développement disposeront d'une **licence exclusive** pour la thérapie humaine.

II.4 Réseaux de surveillance des salmonelles et de l'antibiorésistance.

Les organismes chargés de la sécurité sanitaire des aliments ont pour mission de prévenir l'introduction de bactéries pathogènes dans les aliments, et ceci tout au long de la chaine alimentaire. La prévention des toxi-infections alimentaires s'effectue par des missions de « police sanitaire », de recommandations et d'informations, mais également par une politique de surveillance.

En France, la surveillance des salmonelles et l'évolution de leurs résistances aux antibiotiques est réalisée par plusieurs réseaux :

- **Le Centre National de Référence** des *Salmonella* et *Shigella* (CNRSS), Institut Pasteur, reçoit chaque année 8000 à 10 000 souches de *Salmonella* provenant de laboratoires d'analyses médicales ou de laboratoires de centres hospitaliers. Son rôle principal est de fournir des tendances spatiales et temporelles des sérotypes de salmonelles permettant de détecter une épidémie éventuelle.

■ **Le RESAPATH**, le Réseau de Surveillance de l'Antibiorésistance des Bactéries Pathogènes, animé par l'AFSSA LYON et l'AFSSA Ploufragan. Le RESAPATH a pour objectif d'établir des données statistiques sur l'évolution globale de la résistance aux antibiotiques des principales bactéries pathogènes isolées des bovins, des porcs et des volailles. Il permet également un appui scientifique et technique auprès des laboratoires d'analyses médicales.

■ **Le réseau « S*almonella* »** animé par le Laboratoire d'Etude et de Recherche sur la Qualité des Aliments et des Procédés (LERQAP) de Maisons-Alfort. Ce réseau permet de fournir des données épidémiologiques des sérotypes de salmonelles retrouvés tout au long de la chaine alimentaire.

■ **La Déclaration Obligatoire (DO) des Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC).** Les TIAC sont déclarées à la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS) ou aux DSV.

En Europe, la surveillance est réalisée par :

■ Food and Waterborne Disease (FWD) Network (anciennement ENTERNET), un réseau de surveillance des bactéries pathogènes responsables d'infections humaines. (principalement *Salmonella* et *E.coli* vérotoxinogène). Ce système est piloté par le réseau européen de surveillance de la résistance microbienne (EARSS) [7]

■ L'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, european food safety athority), est L'EFSA est une agence européenne indépendante financée par le budget communautaire, qui fonctionne séparément de la Commission européenne, du Parlement européen et des États membres de l'UE. Le rôle de l'EFSA consiste à évaluer et à communiquer sur l'ensemble des risques liés à la chaîne alimentaire.

III. Mécanismes d'antibiorésistances et transfert de gènes.

III.1 Rappels : modes d'action des principaux antibiotiques.

III.1.1 Qu'est ce qu'un antibiotique ?

Un antibiotique est une substance, naturellement produite par un microorganisme ou, de synthèse, qui a la capacité de pouvoir inhiber la croissance voire de détruire d'autres microorganismes : on parle respectivement d'antibiotiques bactériostatiques ou bactéricides. La caractéristique principale des antibiotiques est leur grande spécificité d'action car ils agissent sur des cibles cellulaires structurales ou métaboliques spécifiques des procaryotes. Cette caractéristique leur permet d'être efficace à de faibles concentrations et d'être, la plupart du temps, non toxiques pour les espèces animales : c'est le principe de la toxicité sélective. Il reste, cependant, les risques de réactions allergiques et, la grande similitude entre les cellules procaryotes et les mitochondries des cellules eucaryotes qui est à l'origine d'une grande toxicité de certains antibiotiques pour les espèces animales (exemple du chloramphénicol).

III.1.1 La cellule bactérienne et sites d'action des antibiotiques.

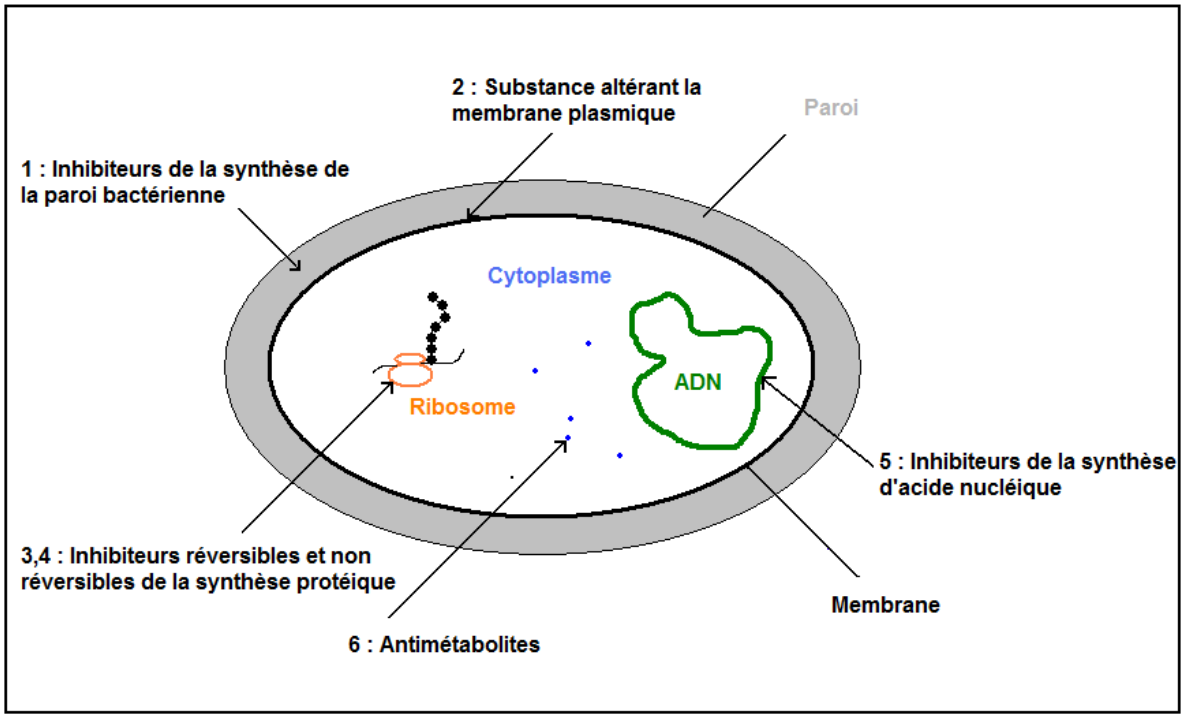


Figure 2 : La cellule bactérienne et sites d'action des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés dans six grandes classes d'agents antimicrobiens (cf. Figure 2).

1 = Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire : pénicillines et céphalosporines, cyclosérine, vancomycine, bacitracine, imidazole et dérivés.
2 = Substances altérant la membrane plasmique : polymixines et colistimethate (détergents), polyène (nystatine et amphotéricine B)
3 = Inhibiteurs réversibles de la traduction (action sur sous-unités ribosomales 30S et 50S) : **chloramphénicol**, **florfénicol**, **tétracyclines,** érythromycine, clindamycine.
4 = Inhibiteurs non réversibles de la traduction (par liaison à la sous-unité 30S) : aminoglycosides (néomycine, **kanamycine, gentamicine, streptomycine, spectinomycine**)
5 = Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (réplication et transcription) : rifampycines, **quinolones**.
6 = Antimétabolites (blocage de certaines étapes du métabolisme énergétique) : trimethoprime, **sulfamides**

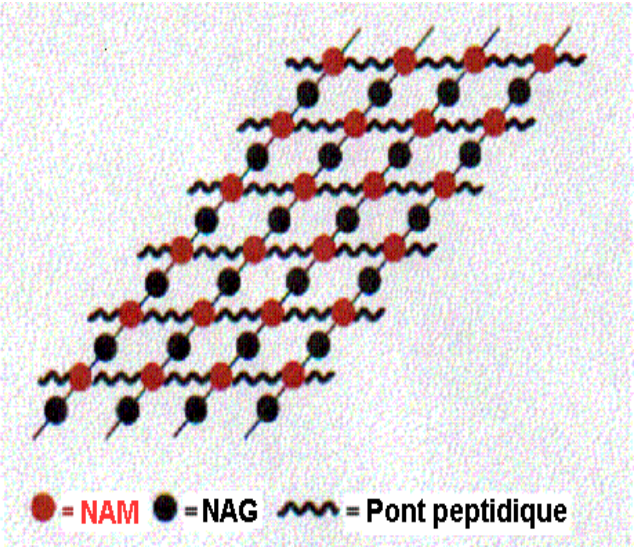
Dans les chapitres suivants, nous traiterons principalement des mécanismes d'action relatifs aux antibiotiques dont les gènes de résistance sont portés par SGI1.

III.1.2 Inhibiteurs de la synthèse de la paroi.

- Synthèse de la paroi bactérienne.

La paroi bactérienne est constituée par le peptidoglycane composé :

- d'une partie glucidique de constitution constante caractérisée par une alternance de N-Acétyl-Glucosamine (NAG) et de N-Acétyl-Muramique (NAM) reliés par des liaisons osidiques β 1-4.
- d'une partie peptidique, variable d'une bactérie à l'autre, composée d'acides aminés reliés au NAM par une liaison amidique, mais également reliés entre eux par une liaison peptidique.



Le peptidoglycane est une molécule polymérisée formant un réseau qui confère la rigidité à la cellule bactérienne (cf. Figure 3).

Figure 3 : Structure du peptidoglycane.

La synthèse du peptidoglycane requiert de nombreuses étapes dont certaines sont la cible d'antibiotiques incluant la cyclosérine, la bacitracine, la vancomycine et les β-lactames (cf.Figure 4).

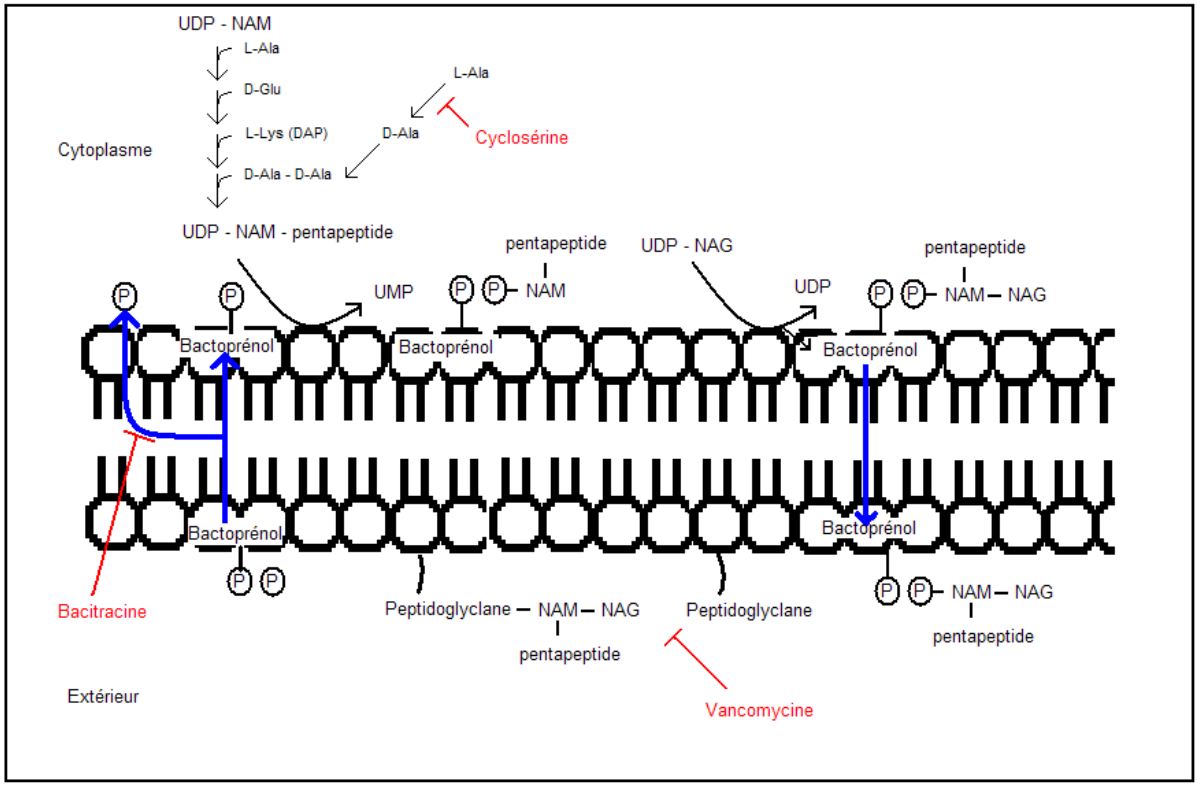


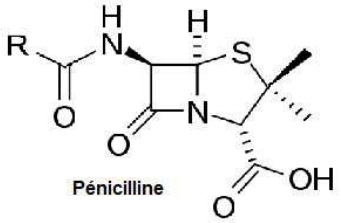
Figure 4 : synthèse de la paroi bactérienne et sites d'action des antibiotiques.

III.1.2.1 Les β-lactames (ou β-lactamines).

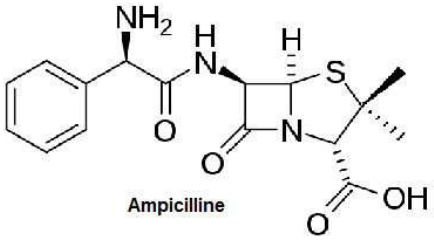
Les β-lactames représentent une famille d'antibiotiques dont la caractéristique commune est la présence d'un anneau β-lactame au sein de leurs structures. Cette famille comprend les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, la fosfomycine et les monobactames.

- **Les pénicillines.**

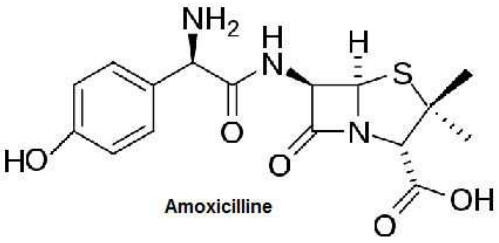
La pénicilline, découverte par Alexandre Fleming, est la première molécule antibiotique mise au point. A partir de sa structure, plusieurs autres molécules ont été obtenues, de manière naturelle, en modifiant simplement le milieu de culture, par hémisynthèse en opérant des modifications chimiques sur une molécule produite naturellement ou par synthèse totale. Toutes les pénicillines comportent donc une même structure de base qui leur confère l'activité antibiotique : un anneau bêta-lactame associé à un anneau thiazolidine. La modification de leurs chaines latérales permet d'obtenir des molécules aux propriétés variables. Elles présenteront des différences au niveau de l'absorption après administration orale, de leur résistance aux pénicillinases et de leurs spectres d'action (cf. Figure 5).



Pénicilline



Ampicilline



Amoxicilline

	Absorption après administration	Résistance aux pénicillinases	Spectre d'action
Pénicilline G	Variable (mauvaise)	Non	Streptocoques, *Neisseria meningitidis,* certains anaérobies, spirochètes, autres
Ampicilline	Bonne	Non	*Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis, Escherichia coli*
Amoxicilline	Excellente	Non	

Figure 5 : les pénicillines

❖ **Les céphalosporines.**

Les céphalosporines sont constituées d'un cycle bêta-lactame associé à un cycle soufré appelé dihydrothiazine : on obtient un noyau cephem sur lequel se greffent des chaînes latérales variables. Il existe quatre générations de céphalosporines aux spectres d'action différents.

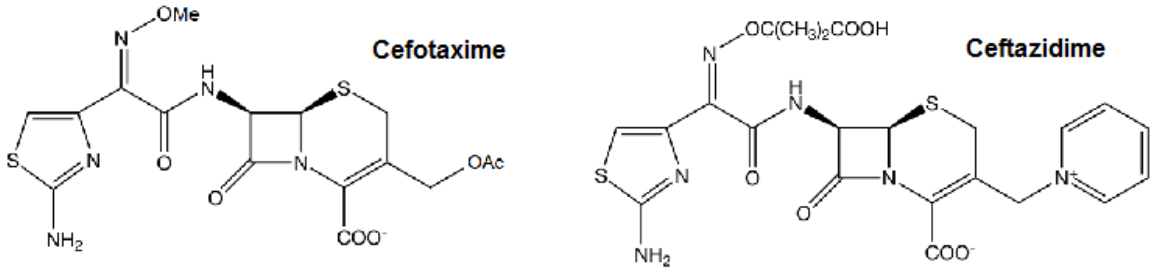


Figure 6 : Structure de la cefotaxime et de la ceftazidime, des céphalosporines de troisième génération.

➪ Mécanisme d'action des β-lactames.

Pénétration jusqu'à la membrane plasmique : la paroi est relativement perméable aux β-lactames car ce sont des molécules de petites tailles. Chez les bactéries gram négatif, le passage à travers la membrane externe est facilité par des canaux non spécifiques, les porines.

Fixation aux PBP (Penicillin Binding Proteins) : les PBP sont des carboxypeptidases ou transpeptidases qu'on retrouve au niveau pariétal et qui interviennent dans les dernières étapes de la synthèse du peptidoglycane. Les β-lactames ont la capacité de se fixer aux PBP car il existe une analogie stérique entre les β-lactames et le pentapeptide, plus précisément, au niveau des deux D-Ala terminaux. La conséquence en est **l'inhibition de la transpeptidation,** étape nécessaire à la liaison des ponts peptidiques du peptidoglycane.

Effet bactériostatique ou bactéricide. La fixation de bêta-lactames sur les PBP induit un effet bactériostatique. Les bactéries néoformées, en présence de bêta-lactames, sont très fragiles car elles présenteront une paroi déficiente et beaucoup moins rigide. L'effet bactéricide est dû à un phénomène autolytique des bactéries. Tout se passe comme si on détruisait l'équilibre entre les différentes enzymes. Les β-lactames, qui inhibent les

polymérases, vont favoriser l'activité des hydrolases qui dégradent les peptidoglycanes. C'est un effet indirect décalé dans le temps.

III.1.3 Substances altérant la membrane plasmique.

Les polymyxines sont des polypeptides amphipatiques, extraits de bacilles, qui agissent comme les détergents. Elles désorganisent la membrane externe des bactéries gram négatif en s'attaquant aux phospholipides provoquant une dialyse de la cellule et la mort de celle-ci. Les polymixines ne peuvent pas agir sur la membrane des bactéries gram positif protégée par la paroi bactérienne.

III.1.4 Inhibiteurs de la synthèse protéique.

Les mécanismes impliqués dans la synthèse protéique sont la cible de divers antibiotiques (cf Figure 7)

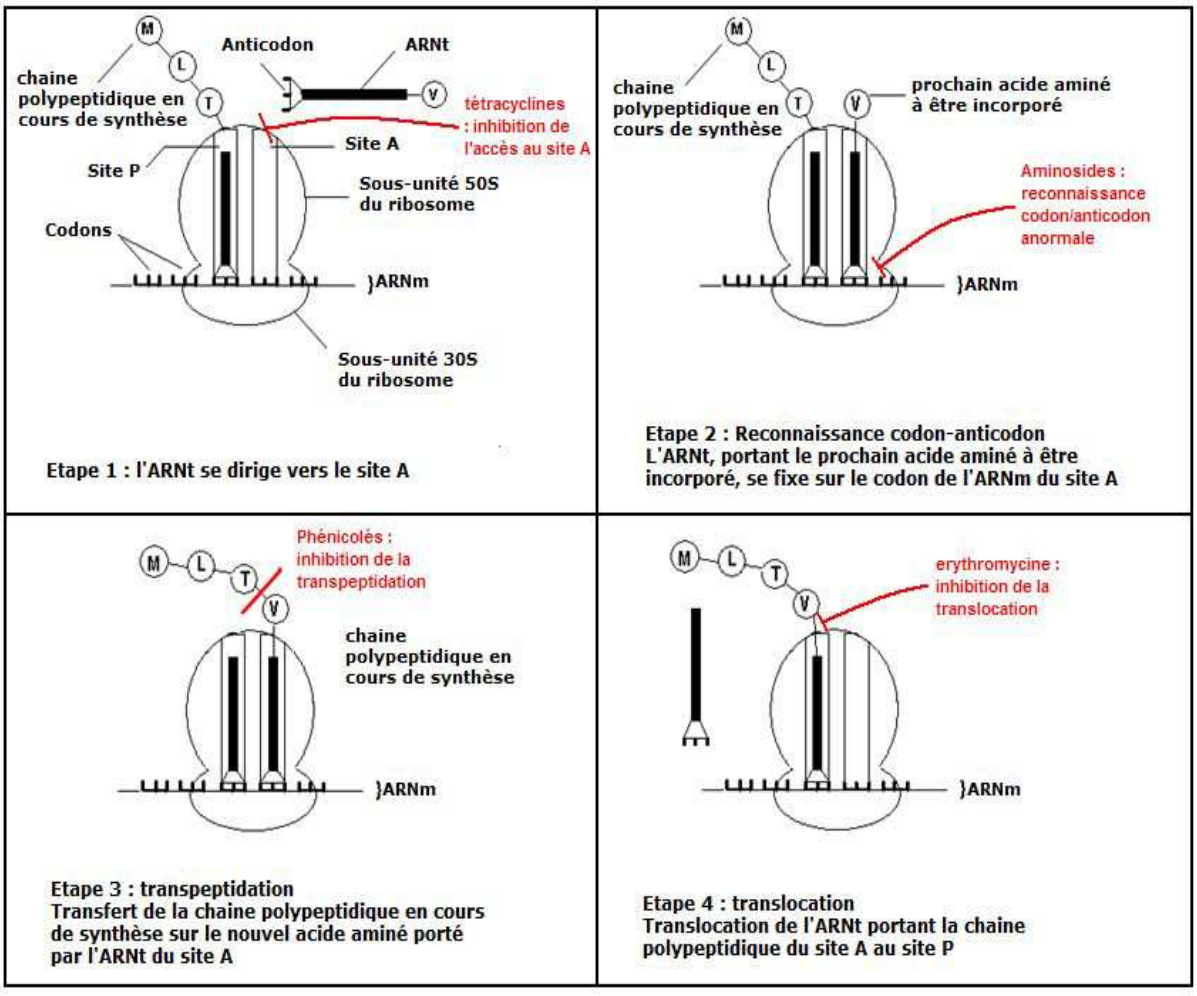


Figure 7 : La synthèse protéique et les sites d'actions des antibiotiques.

III.1.4.1 Les aminosides.

Egalement appelés aminoglycosides, les aminosides sont des molécules constituées de plusieurs sucres aminés reliés par des liaisons glycosidiques. On distingue cinq familles d'aminosides qui se différencient par la nature de leurs sucres aminés : la néomycine, **la kanamycine, la gentamicine, la streptomycine et la spectinomycine.** Toutes sont issues d'un streptomyces excepté la gentamicine.

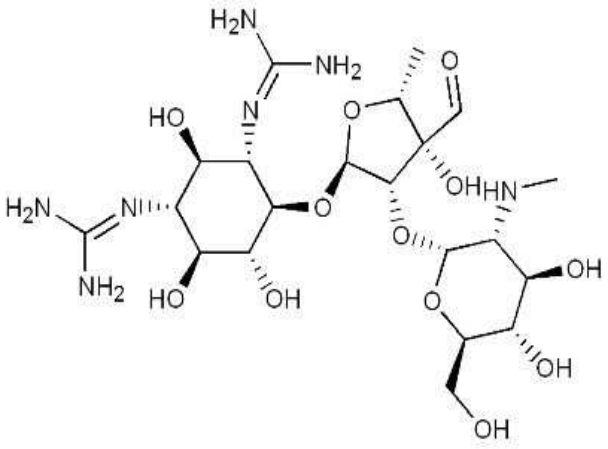


Figure 8 : structure de la streptomycine

- Mécanisme d'action.

Pénétration jusqu'à la membrane plasmique. Les aminosides diffusent à travers les porines de la membrane externe des bactéries gram négatif. La pénétration dans la bactérie à travers la membrane interne nécessite des transporteurs actifs.

Fixation aux polysomes. Une fois dans le cytoplasme, les aminosides se lient aux polysomes et interfèrent dans la synthèse protéique. Ils inhibent la reconnaissance du codon de l'ARNm avec l'anticodon de l'ARNt. La cible prioritaire des aminosides est la sous-unité 30S des ribosomes au niveau de laquelle se trouvent des protéines ribosomales et l'ARN 16S.

Effet bactéricide. L'action des aminosides entraîne une incorporation d'acides aminés frauduleux qui a pour conséquence, entre autres, l'incorporation de protéines membranaires défectueuses entrainant une dérégulation de perméabilité de la membrane plasmique. Ce qui facilitera l'entrée d'autres molécules d'aminosides. La modification de la membrane plasmique est responsable de l'activité bactéricide des aminosides.

III.1.4.2 Les tétracyclines.

La première molécule de **tétracycline** découverte est la chlorotétracycline qui est une molécule naturelle. Deux autres molécules naturelles ont ensuite été découvertes et constituent ainsi la première génération de tétracycline (L'oxytetracycline et la demeclocycline).

Trois molécules de tétracyclines ont, par la suite, été produites par hémisynthèse et constituent la deuxième génération. Les molécules de seconde génération ont subi des modifications qui ont permis d'augmenter leur biodisponibilité.

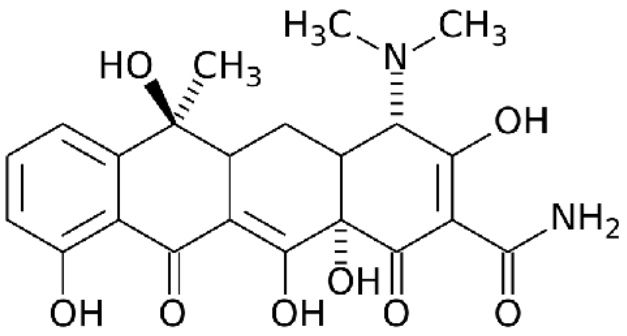


Figure 9 : structure de la tétracycline.

- Mécanisme d'action.

Pénétration jusqu'à la membrane plasmique. Chez les bactéries gram négatif, la tétracycline diffuse passivement à travers les aquapores de la membrane externe puis est transportée via un système de transport actif (pompe membranaire). Chez les bactéries gram positif, la tétracycline pénètre également par un système énergie dépendant dont le mécanisme est encore mal connu.

Fixation à la sous unité 30 S. Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en se fixant à la sous unité 30 S du ribosome. Ils inhibent l'étape d'élongation en inhibant l'accès au site A à l'ARNt.

III.1.4.3 Les phénicolés.

Les phénicolés sont des molécules chlorées dont fait partie le **chloramphénicol** qui est une molécule naturelle à partir de laquelle des dérivés seront produits (ex : le thiamphénicol). Aujourd'hui, la synthèse totale des phénicolés est préférée pour obtenir une plus grande capacité de production.

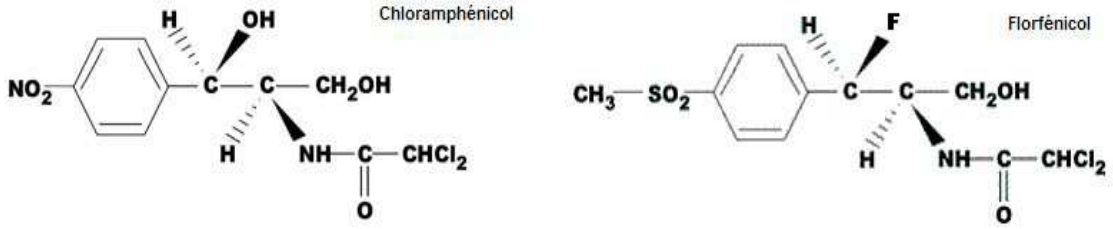


Figure 10 : structure du chloramphénicol et du florfenicol.

- Mécanisme d'action.

Les phénicolés inhibent la synthèse protéique en se fixant à la sous unité 50 S du ribosome au niveau du site de la transpeptidase. Ils inhibent la formation de la liaison peptidique lors de la phase d'élongation en inhibant la transpeptidation.

III.1.5 Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques.

Les quinolones sont des molécules de synthèse constituées de deux cycles aromatiques : un cycle benzène et un cycle azoté qui forment le noyau quinoléine.
Sur ce noyau se greffent des radicaux : une fonction cétone en C4, une fonction acide en C3.
On obtient alors l'acide 4-oxoquinoléine qui est la molécule de base des quinolones. A partir de cette molécule, on distingue les molécules de première génération qui sont représentées par **l'acide nalidixique** et les molécules de seconde génération représentées par des molécules fluorées, **les fluoroquinolones.**

- Mécanisme d'action.

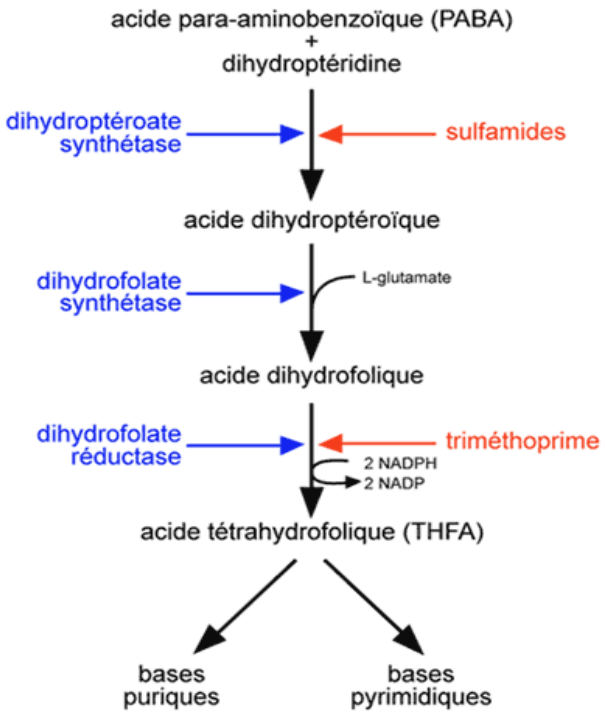
Pénétration jusqu'à la membrane plasmique. Les quinolones diffusent librement à travers la paroi et la membrane plasmique.

Inhibition de l'ADN girase. Les quinolones inhibent l'activité de l'ADN girase qui permet le superenroulement négatif de l'ADN nécessaire pour éviter la vrille de l'ADN lors de l'ouverture de la double hélice pendant les phases de réplication et de transcription.

L'inhibition de la girase va provoquer une relaxation exagérée de l'ADN mais également sa fragmentation en raison de l'inhibition de l'activité de liaison de la girase.

Effet bactériostatique ou bactéricide. Les quinolones peuvent avoir une action bactériostatique, par inhibition de la réplication, ou une action bactéricide en raison d'une réponse SOS exagérée qui va favoriser le développement anarchique des bactéries et conduire à une filamentation bactérienne (lyse des bactéries).

III.1.6 Inhibiteurs de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique.



L'acide tétrahydrofolique (THFA) est un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques nécessaire à la synthèse des acides nucléiques (cf. Figure 11)

Figure 11 : Synthèse de l'acide tetrahydrofolique et sites d'actions des antibiotiques.

III.1.6.1 Les sulfamides.

Les **sulfamides** sont les premiers agents chimiothérapeutiques à être utilisés de façon systémique. Ils ont été découverts dans un colorant industriel : le protonsil.

- Mécanismes d'action.

Les sulfamides sont des analogues structuraux du PABA. Ils vont agir comme des inhibiteurs compétitifs de la dihydroptéroatesynthase (cf.Figure 11).

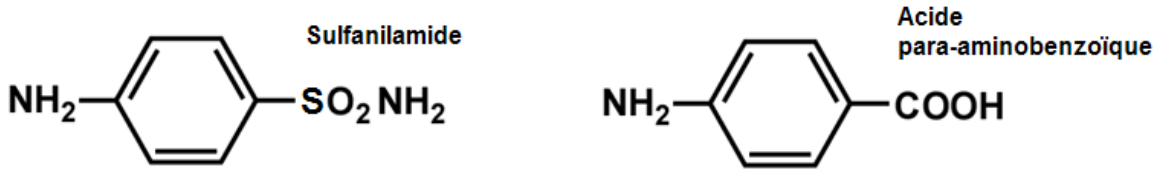


Figure 12 : Structure de l'acide para-aminobenzoïque (PABA) et d'un sulfamide (sulfanilamide).

III.1.6.2. Les diaminopyridines.

- Mécanisme d'action.

Les diaminopyrimidines inhibent la dihydrofolate réductase par compétition avec le résidu ptérine. La dihydrofolate réductase est une enzyme présente chez toutes les bactéries mais également chez les mammifères. Les diaminopyrimidines ont cependant une affinité beaucoup plus importante pour les enzymes bactériennes que pour les enzymes humaines.
A noter que les sulfamides et les diaminopyridines ont une action bactéricide car l'inhibition du THF entraine l'inhibition de la synthèse d'ADN.

III.2 Résistances aux antibiotiques.

III.2 1 Qu'est ce que la résistance aux antibiotiques ?[8, 9]

Depuis l'introduction de la pénicilline, de nombreuses molécules d'antibiotiques ont été développées et commercialisées. Elles ont permis une amélioration considérable de la santé publique et animale. L'optimisme initial, a cependant, rapidement laissé place à l'inquiétude en raison de l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques et de la rapide dissémination des gènes de résistance dans le monde bactérien, entre des bactéries de même espèce ou de même genre.

Mais qu'appelle-t-on résistance aux antibiotiques ? La définition de la résistance aux antibiotiques est différente selon que l'on se place d'un point de vue clinique ou bactériologique.

D'un point de vue bactériologique, une bactérie est dite résistante à un antibiotique si elle possède un mécanisme de défense lui permettant de survivre et de se multiplier en présence d'antibiotiques.

D'un point de vue clinique, on parle de résistance quand la concentration en antibiotique nécessaire pour obtenir l'effet voulu (bactériostatique ou bactéricide) est supérieure ou égale à la concentration en antibiotique toxique pour le malade. Dans ce cas, des critères pharmacodynamiques et cliniques sont à considérer.

Il faut également différencier la résistance intrinsèque des bactéries et les résistances acquises.

La résistance intrinsèque se définit par une résistance aux antibiotiques due aux propriétés intrinsèques physiologiques, biochimiques ou structurales de la bactérie qui sont indépendantes de tout contact avec un antibiotique. (Membrane externe, efflux actif, capsule, matrice des biofilms).

La résistance acquise, comme son nom l'indique, se définit par une résistance acquise en raison d'une pression environnementale. On distingue les résistances acquises par mutation spontanée de gènes chromosomiques, des résistances acquises par transfert horizontal (cf.III.3) qui constitue le phénomène prépondérant.

III.2.2 La résistance intrinsèque : exemples de mécanismes.

Pour parvenir à leurs cibles, les antibiotiques doivent franchir plusieurs barrières physiques qui constituent le principal mécanisme de résistance intrinsèque.

Citons, comme exemple, **la capsule**, **la paroi bactérienne**, la ou **les membranes cellulaires** mais également **la matrice protectrice extracellulaire** produite par les bactéries organisées en biofilm.

Il existe deux types de bactéries : les bactéries à gram négatif et celles à gram positif qui se différencient par leurs parois bactériennes (cf. Figure 13).

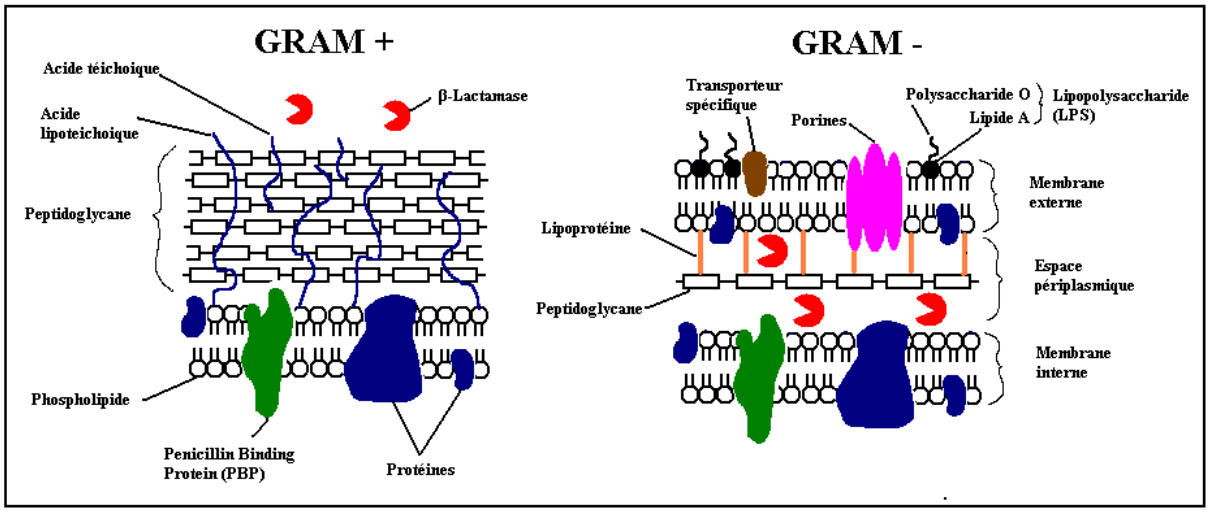


Figure 13 : Représentation schématique des parois bactériennes des bactéries gram + et gram –

Sans faire une description détaillée de la structure pariétale des deux types de bactéries, observons les caractéristiques qui influent sur la pénétration des antibiotiques dans la cellule.

Les bactéries à gram positif possèdent une seule membrane phospholipidique. Sa paroi cellulaire, composée de nombreuses couches de peptidoglycane, est très difficilement pénétrable par des molécules de grande taille. De plus, des enzymes inactivant les β-lactamines, les β-lactamases, sont présentes à l'extérieur de la paroi.

Les bactéries à gram négatif possèdent deux membranes phospholipidiques, les deux étant séparées par un espace périplasmique contenant une très fine couche de peptidoglycane et dans lequel nous retrouvons des β-lactamases. La membrane externe présente une perméabilité limitée qui contribue à ralentir l'entrée des antibiotiques. Cependant, elle comporte également des canaux non spécifiques, les porines, qui permettent une entrée plus facile des petites molécules chargées et notamment les antibiotiques.

Outre les barrières physiques, les systèmes d'efflux actifs représentent un autre mécanisme de résistance intrinsèque. (cf. III.2.3.3)

III.2.3 La résistance acquise : exemples de mécanismes.[10]

Sous pression de sélection, les mutations chromosomiques ou les transferts horizontaux de gènes de résistance aux antibiotiques conduisent à l'acquisition de mécanismes de défense (cf. Figure 14).

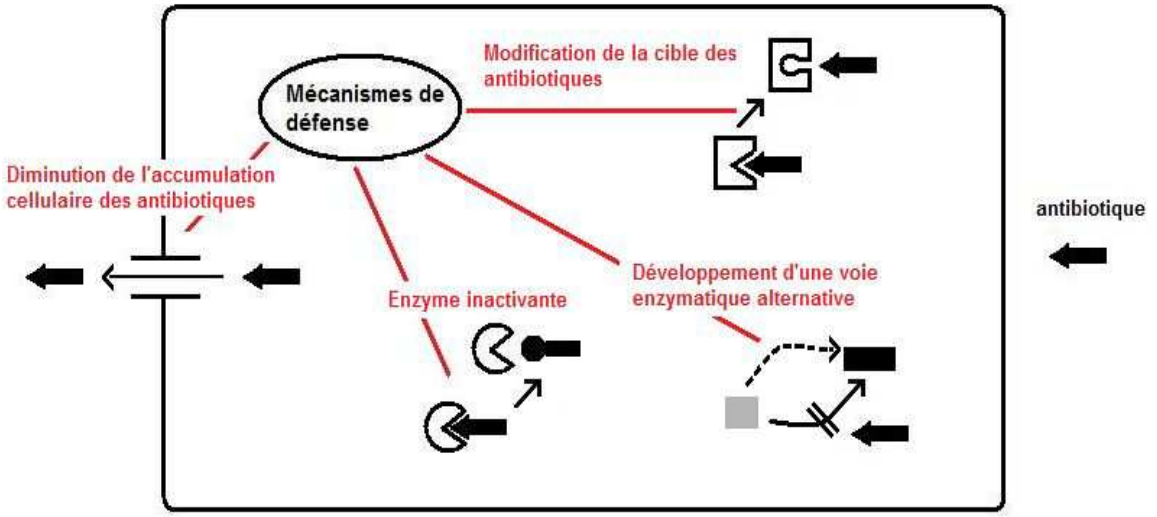


Figure 14 : Principaux mécanismes de résistances acquises aux antibiotiques.

III.2.3.1 Enzymes inactivantes.

Certains gènes de résistance codent des enzymes capables de détruire ou d'inhiber les molécules antibiotiques. Les enzymes inactivantes catalysent des réactions variées.

Exemple : Les β-lactamases, présentes sur la face extérieure de la paroi des bactéries gram + et dans l'espace périplasmique des bactéries gram-, sont des enzymes capables de détruire les β-lactames en clivant l'anneau β-lactame. Il existe approximativement 350 à 400 β-lactamases spécifiques de différentes molécules β-lactames. Le gène $\boldsymbol{bla}_{\mathbf{PSE\text{-}1}}$ de SGI1 code une β-lactamase capable d'inactiver les pénicillines et la carbapenicilline.

Le gène ***aadA2*** de SGI1 code une enzyme, l'aminoglycoside-O-adenyltransferase, qui inhibe l'activité antibiotique des molécules de streptomycine et de spectinomycine en leurs transferant un groupe adenyl.

III.2.3.2 Modifications des cibles des antibactériens.

Les mutations spontanées entrainent souvent une modification des cibles des antibiotiques, notamment au niveau des sites de liaison.

Exemple : Des mutations spontanées au niveau du gène *gyrA* entraine une modification de l'ADN girase qui a pour conséquence une baisse de l'efficacité des quinolones dont l'affinité pour le site de liaison est réduite.

Le gène *armA* code pour une 16S ARNr méthylase qui modifie chimiquement la cible des aminosides. Il confère ainsi un haut niveau de résistance à tous les aminosides excepté la streptomycine.

III.2.3.3 Diminution de l'accumulation cellulaire des antibactériens.

Les bactéries possèdent intrinsèquement des systèmes d'efflux actif, dit « énergie-dépendant », qui leur permettent de diminuer l'accumulation cellulaire des antibiotiques. Les gènes codant les systèmes d'efflux sont portés par le chromosome ou, par des éléments génétiques mobiles. Ils peuvent ainsi être acquis par transfert horizontal ou par mutation chromosomique d'un gène régulateur ou effecteur des systèmes d'efflux. Les mutations modulant la résistance aux antibiotiques induisent, soit une augmentation de l'expression des pompes membranaires, soit une augmentation de l'efficacité de ces pompes due à des substitutions d'acides aminés.
Les systèmes d'efflux peuvent être spécifiques d'un antibiotique particulier ou de plusieurs antibiotiques différents : dans ce cas, la bactérie est multirésistante.

La diminution de l'accumulation cellulaire des antibiotiques peut également résulter d'une baisse de la perméabilité de la membrane. Certaines mutations chromosomiques peuvent avoir pour conséquence une modification du LPS caractérisée par des changements au niveau de l'antigène O. Cette modification entraine un changement de la charge globale de la surface bactérienne entrainant une diminution de l'efficacité de liaison de certains antibiotiques cationiques.

Exemple : Les gènes ***tet(A)*** et ***tet(G)*** de SGI1 codent une pompe membranaire constituée de 12 segments transmembranaires qui a la capacité d'exporter vers l'extérieur de la cellule, la tétracycline, l'oxytetracycline, la chlortetracycline et la doxycycline.

Le gène ***floR*** de SGI1 code une pompe membranaire capable d'exporter le chloramphénicol et le florfénicol [11].

III.2.3.4 Développement d'une voie enzymatique alternative.

Il est possible pour les bactéries de contourner la voie « sauvage » en développant une voie enzymatique alternative.

Exemple : Les sulfamides ont pour cible la dihydroptéroate synthase impliquée dans la synthèse de l'acide tétrahydrofolique. Le gène ***sul1*** de SGI1 code une dihydroptéroate synthase résistante aux sulfamides mais qui conserve son affinité pour ses substrats naturels.

III.3 Transferts des gènes de résistance.

Les génomes représentent des structures dynamiques dans lesquelles se produisent de nombreux réarrangements génétiques essentiels à l'évolution des bactéries. Ces réarrangements génétiques conduisent parfois à l'acquisition de nouvelles résistances aux antibiotiques qui représentent un avantage considérable pour la survie des bactéries. Les gènes de résistance, lorsqu'ils sont portés par le chromosome, sont transmis de manière verticale à la descendance suite aux divisions cellulaires. Les cellules filles récupèrent une copie du gène de résistance via un système de **transfert** dit « **vertical** ».

Bien qu'il permette la dissémination des gènes de résistance, le transfert vertical reste un système limité. Le **transfert** dit « **horizontal** » contribue plus efficacement à la propagation des gènes de résistances puisqu'il consiste en un transfert de gènes entre différentes cellules non reliées phylogénétiquement et pouvant appartenir à des espèces ou des genres différents.

III.3.1 Mécanismes de transfert de gènes.

Il existe trois mécanismes principaux de transfert horizontal d'éléments génétiques :

- **La transformation :** un ADN libre est intégré au chromosome ou à un plasmide d'une bactérie.
- **La conjugaison :** un élément génétique mobilisable est transféré d'une bactérie à une autre.
- **La transduction** : un segment d'ADN est transféré d'une bactérie à une autre via un bactériophage.

III.3.1.1 La transformation.

La transformation est le transfert passif d'un ADN libre, dit exogène, issu d'une bactérie lysée vers une bactérie réceptrice en état de compétence. L'état de compétence se caractérisant par un état physiologique génétiquement programmé qui permet la capture d'ADN présent dans l'environnement.
La fixation et l'absorption de l'ADN libre par la cellule compétente est suivie d'une potentielle recombinaison génétique qui conduit à l'insertion de l'ADN exogène dans le génome bactérien et à l'acquisition de nouveaux caractères génétiques stables et transmissibles.

La transformation a un rôle limité dans le transfert horizontal de gènes car elle nécessite que de nombreuses conditions soient réunies.

- L'ADN libre est rapidement dégradé dans l'environnement.
- L'ADN, pour être absorbé, doit être bicaténaire et sa taille joue un rôle important.
- Les espèces bactériennes naturellement compétentes sont peu nombreuses. En outre, l'état de compétence n'apparait qu'à certains stades de la division cellulaire.
- Après son absorption, l'ADN libre est dégradé par les exonucléases de la bactérie compétente.
- L'ADN absorbé doit présenter une importante similarité nucléotidique avec l'ADN de la cellule réceptrice pour qu'une recombinaison homologue puisse se produire. La transformation n'est possible qu'entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces voisines.

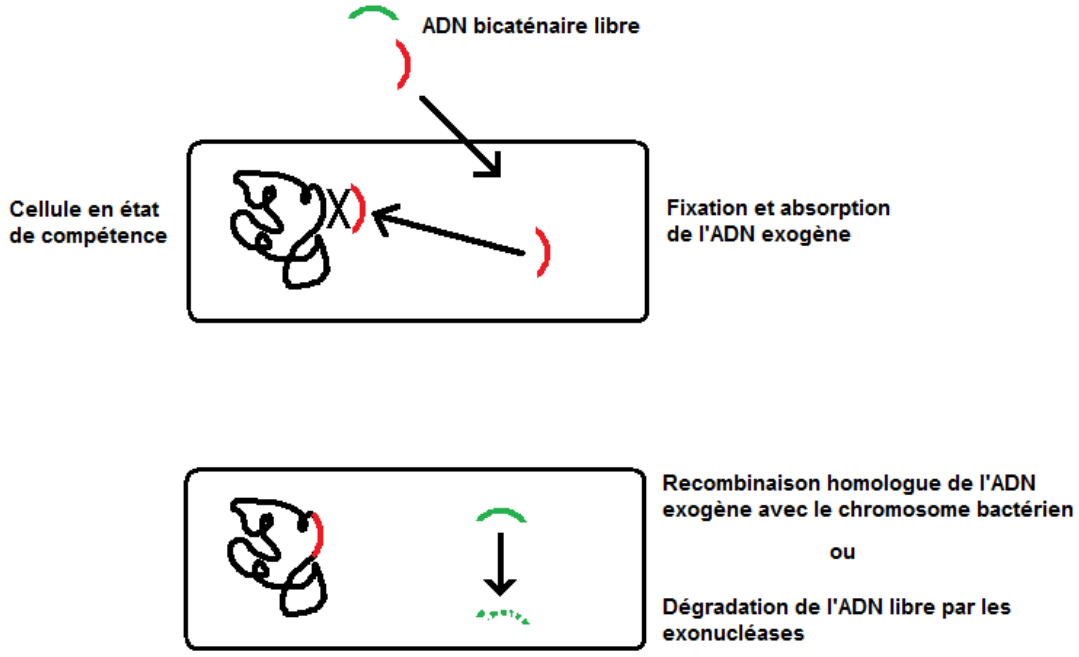


Figure 15 : La transformation

III.3.1.2 La transduction.

La transduction est le transfert d'ADN par l'intermédiaire de bactériophages. Les bactériophages sont des virus de bactéries que l'on peut trouver sous forme virulentes ou tempérés.

III.3.1.2.1 Cycles du bactériophage.

Après pénétration dans la bactérie, deux possibilités existent :

- Le phage sous forme tempéré est capable d'insérer son génome dans le chromosome bactérien. Il est sous forme latente et perd ses capacités à se répliquer de façon autonome. Son ADN est répliqué en même temps que le chromosome bactérien et est transmis aux cellules filles: on parle de **cycle lysogénique** et le virus est appelé **prophage**.

- Le phage virulent détourne le métabolisme cellulaire de la bactérie qu'il a infectée afin qu'elle le réplique et le traduise. La bactérie produit alors des particules virales dans

lesquelles seront encapsidées les copies du génome viral. La bactérie est ensuite lysée, libérant les nouveaux virions qui vont pouvoir infecter d'autres cellules : on parle de **cycle lytique**.

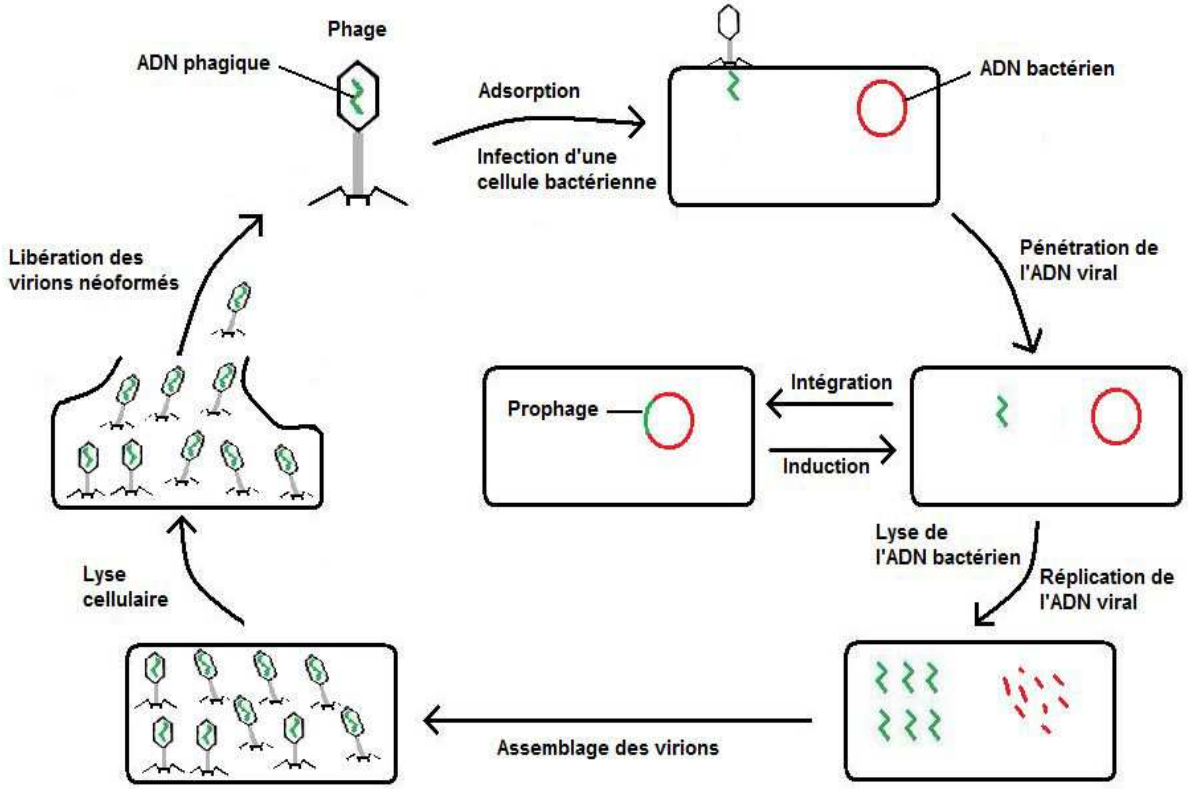


Figure 16 : Cycle du bactériophage.

Il existe deux types de transduction : la transduction généralisée et la transduction localisée.

III.3.1.2.2 La transduction généralisée.

La transduction généralisée se produit lors du cycle lytique. Lors de la lyse de l'ADN bactérien, des fragments d'ADN, de taille similaire à l'ADN phagique, peuvent se trouver encapsidés par erreur dans les particules virales. Le nouveau phage ainsi formé est dit défectif car il perd ses fonctionnalités et ne peut plus se répliquer. Il peut cependant infecter une autre cellule bactérienne dans laquelle l'ADN bactérien encapsidé va être libéré.

Deux modalités sont alors possibles :

■ L'ADN libéré peut subir une recombinaison homologue et s'intégrer dans le chromosome bactérien. La **transduction** est dite **complète**. La bactérie a acquis un élément génétique stable et transmissible à la descendance.

■ L'ADN peut être dégradé ou rester sous forme libre tout en gardant ses fonctionnalités et en étant exprimé. Ce fragment n'est pas répliqué et n'est pas transmis à la descendance. On parle de **transduction abortive**.

La transduction est dite généralisée car n'importe quel fragment de l'ADN bactérien peut être encapsidé dans les particules virales.

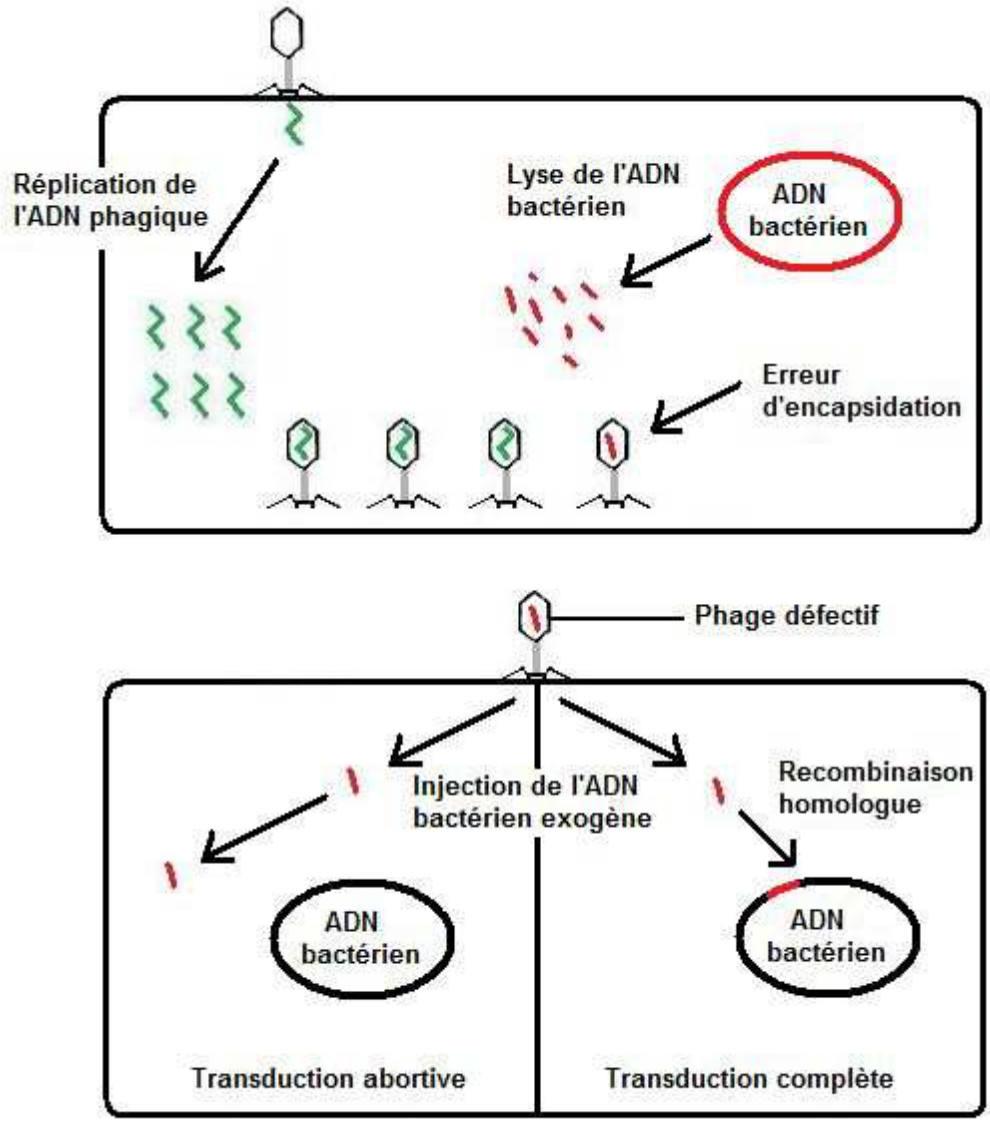


Figure 17 : la transduction généralisée.

III.3.1.2.3 La transduction localisée.

Dans certaines bactéries, un prophage se libére du chromosome bactérien pour démarrer un cycle lytique. Lors de son excision, le prophage peut quelquefois emporter avec lui des gènes issus du chromosome bactérien. On obtient alors un ADN hybride constitué d'un fragment d'ADN phagique et d'un fragment d'ADN bactérien. La transduction est dite localisée car les fragments d'ADN bactérien mobilisés ne peuvent être que ceux adjacents au prophage.

Le phage contenant l'ADN hybride, dit défectif, peut alors infecter une nouvelle bactérie mais aura perdu ses capacités de cycle lytique. Comme pour la transduction généralisée, deux voies sont possibles : la transduction complète ou abortive.

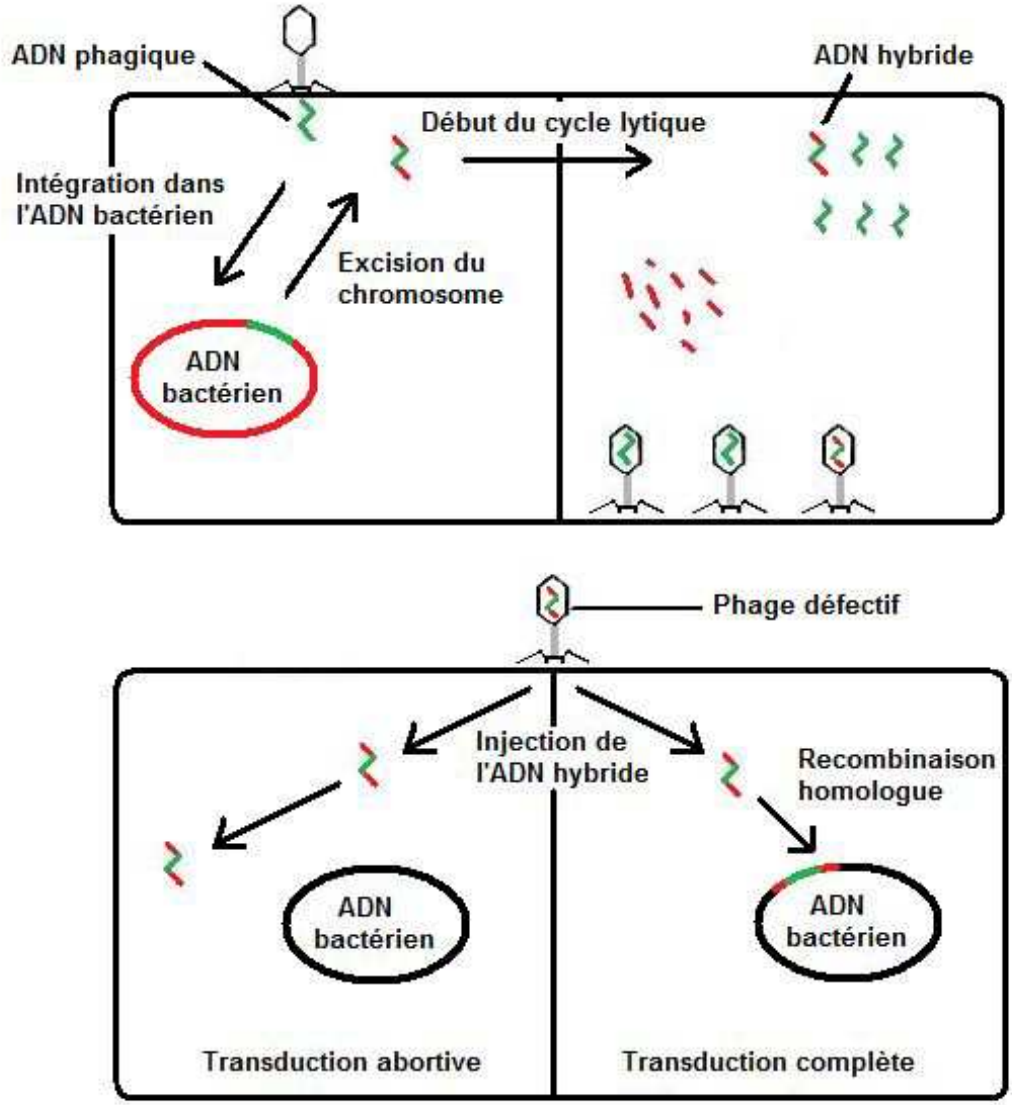


Figure 18 : la transduction localisée.

Le rôle de la transduction dans la dissémination des gènes de résistance est plus important que celui de la transformation mais reste cependant limité du fait qu'il existe une spécificité étroite d'hôtes des bactériophages. Et contrairement à la conjugaison, la taille des fragments mobilisés ne peut dépasser 50 kb.

III.3.1.3 La conjugaison.

La conjugaison est le transfert d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice via un processus sexuel nécessitant un contact et un appariement entre deux bactéries de sexes différents.

III.3.1.3.1 Le Facteur F.

La bactérie donatrice, dite mâle, possède un plasmide appelé facteur de sexualité ou de fertilité : le facteur F. Les bactéries mâles sont dites F+. La bactérie réceptrice, dite femelle, est dépourvue de ce facteur F. Les bactéries femelles sont F-. Le facteur F possède les gènes nécessaires à la synthèse des pili sexuels qui reconnaissent par leurs extrémités les zones de contact à la surface des bactéries F- et s'y fixent. Se forme alors un pont cytoplasmique par lequel aura lieu le transfert d'ADN qui se fait à sens unique, orienté et progressif.

Plusieurs processus de transfert sont possibles :

- Le facteur F est libre. Le processus de conjugaison se déroule, permettant la réplication et le transfert du facteur F vers une bactérie réceptrice qui devient alors mâle.

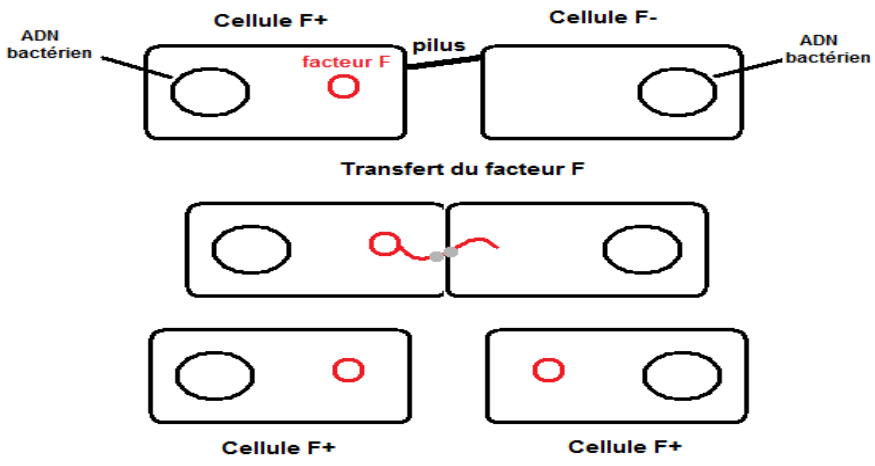


Figure 19 : Conjugaison du facteur F libre.

■ Dans une population de souches F+, il peut quelquefois se produire une intégration du facteur F dans le chromosome bactérien. Les souches sont alors dites HFr. (Haute Fréquence de Recombinaison). Le processus de conjugaison permet la réplication et la transmission, non seulement du facteur F, mais également des gènes du chromosome. Il est rare que la totalité du chromosome soit transféré. Il se produit souvent une cassure qui stoppe le processus. Le transfert étant polarisé à partir du site oriT appartenant au facteur F, plus la distance entre le site *oriT* et le gène est grande, moins fréquemment le gène est transféré. Suite au transfert, certaines régions du brin monocaténaire exogène et celles de l'ADN receveur subissent une recombinaison homologue permettant à la cellule réceptrice l'acquisition de nouveaux caractères génétiques stables. L'ADN restant sous forme linéaire est dégradé.

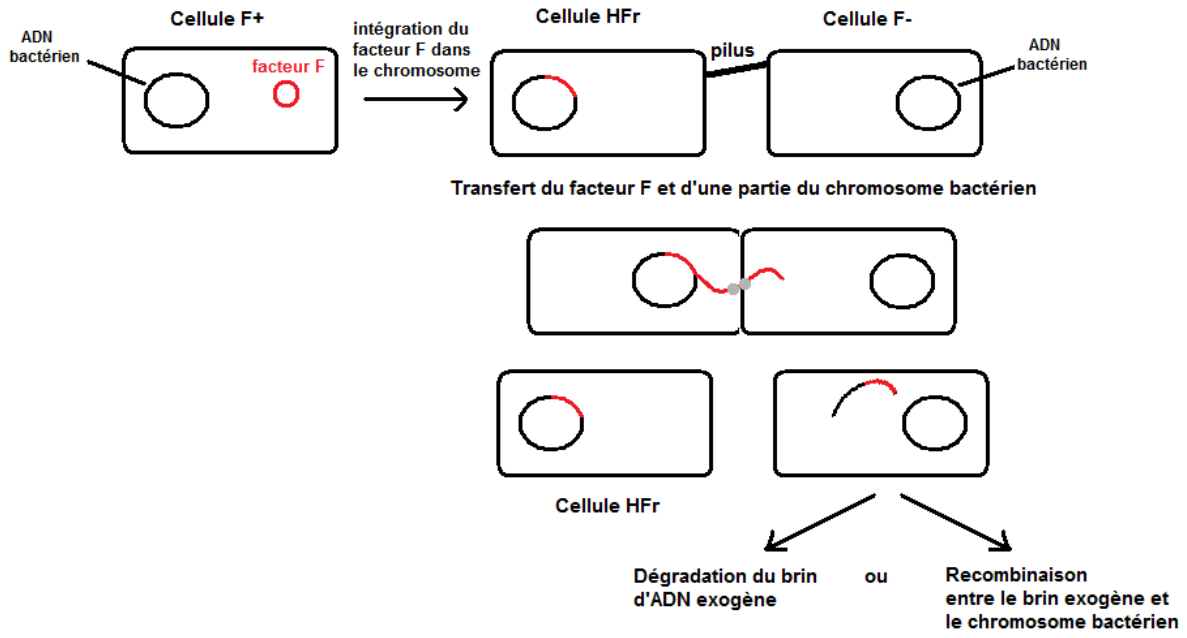


Figure 20 : Conjugaison à partir d'une souche HFr.

■ Le facteur F intégré au chromosome peut revenir à l'état autonome emportant potentiellement avec lui certains gènes du chromosome. Le résultat est un plasmide F' composé du facteur F et de ces gènes bactériens. Suite au processus de conjugaison, la bactérie réceptrice reçoit le plasmide F ' : c'est la F-duction. Une recombinaison peut alors se produire permettant le transfert de nouveaux gènes dans le chromosome bactérien de la cellule réceptrice. Dans le cas contraire, les gènes restés sur le plasmide F' seront mobilisables d'une bactérie à une autre.

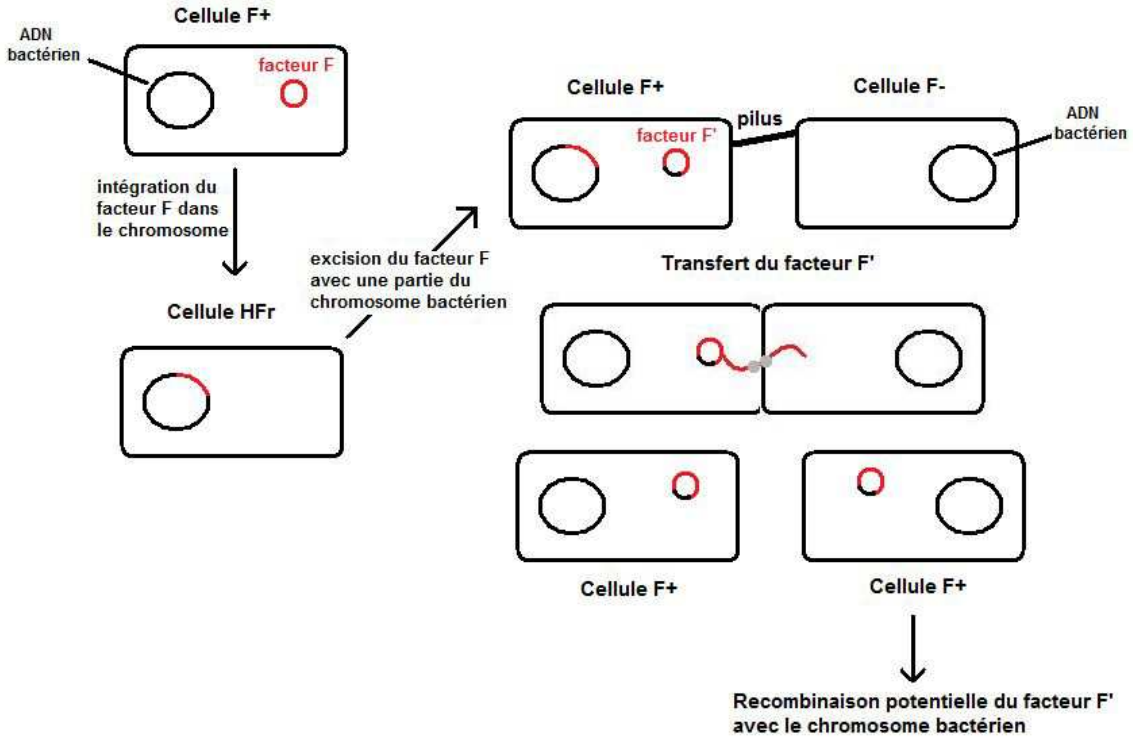


Figure 21 : La F-duction.

Outre le facteur F, de nombreux éléments génétiques mobiles sont capables d'assurer seuls leurs transferts intercellulaires via un mécanisme de conjugaison. Ces éléments mobiles incluent les plasmides et les éléments intégratifs mobiles ou conjugatifs (IMEs et ICEs) (cf. III.3.2).

III.3.2 Eléments génétiques mobiles.[9, 12, 13]

Les éléments génétiques mobiles sont des segments d'ADN qui codent des enzymes et d'autres protéines qui permettent leurs mouvements à l'intérieur du génome (mobilité intracellulaire) ou entre cellules bactériennes (mobilité intercellulaire)

III.3.2.1 Les plasmides.[14]

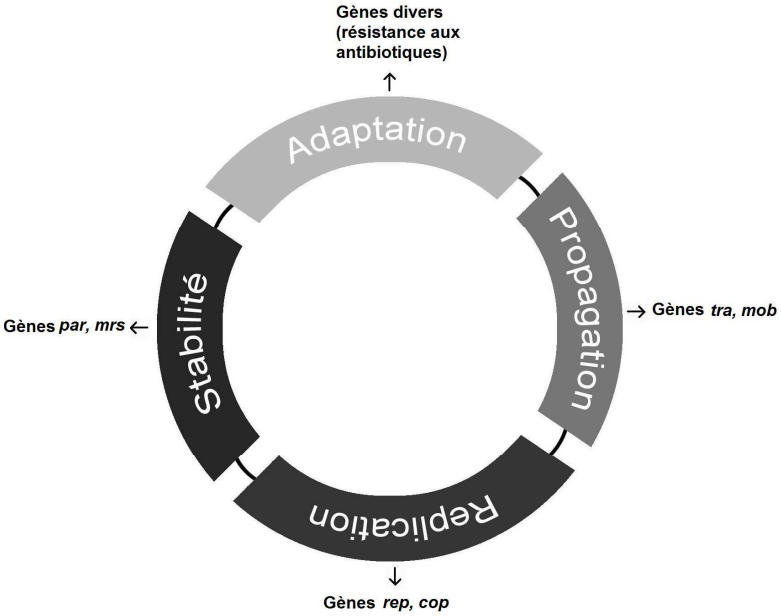
Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomique bicaténaires et généralement circulaires, d'une taille pouvant varier de moins de 2 kb à plus de 100 kb. Ce sont des structures stables, capables de réplication autonome, constituées de modules génétiques codant des fonctions non essentielles à la survie des bactéries en conditions physiologiques normales.

Leurs structures incluent obligatoirement des gènes codant les fonctions réplicatives mais peuvent également présenter un assortiment variable de gènes « accessoires » qui codent des processus distincts de ceux codés par le chromosome bactérien. Les plasmides permettent ainsi, aux bactéries qui les portent, l'acquisition de nouveaux phénotypes tels que la résistance aux antibiotiques.

Pour assurer leur maintien dans les cellules bactériennes, les plasmides doivent assurer leurs réplications, contrôler leurs nombres de copies et assurer leur transmission aux cellules filles lors des divisions cellulaires. Il est impossible pour des plasmides qui possèdent le même mécanisme de réplication de coexister dans la même cellule, on parle alors d'incompatibilité. Cette caractéristique a permis la classification des plasmides en groupe d'incompatibilité (groupe Inc) Les plasmides appartenant au même groupe présentent de larges homologies génétiques et sont généralement fortement apparentés.

La structure d'un plasmide est potentiellement composée de quatre modules :

- **Le module de réplication** (gène *rep*) code pour les fonctions nécessaires à la réplication du plasmide. Le plus simple des plasmides peut être constitué uniquement de ce module. Le gène *rep* est souvent associé au gène *cop* qui assure la stabilité du nombre de copies de plasmides dans la cellule.
- **Le module de stabilité** (gènes *par* et *mrs*) assure la transmission verticale du plasmide ainsi que la « fidélité segregationnelle ».
- **Le module de propagation** (gènes *tra* et *mob*) assure la mobilité intercellulaire des plasmides. Les plasmides conjugatifs (*tra*+) possèdent les fonctions codées par le gène *tra* qui permettent la synthèse des pili, la stabilisation et l'agrégation de l'ADN simple brin lors du transfert conjugatif. Les plasmides non conjugatifs (*tra*-, *mob*+) possèdent une origine de transfert oriT et sont mobilisables uniquement en présence d'un second plasmide tra+ qui met en place tout l'appareil conjugatif. Les plasmides (tra-, mob-) peuvent être mobilisés en formant un coïntégrat avec un plasmide conjugatif.
- **Le module d'adaptation** est constitué de gènes additionnels codant généralement pour des fonctions diverses qui permettent à la bactérie de survivre dans des environnements spécifiques. Les avantages fournis par ce module incluent la production de facteurs de virulence qui permettent la colonisation des cellules, la protection contre les antibiotiques et les métaux lourds ou la capacité de métaboliser certaines sources de carbone.



Les plasmides ont une fonction essentielle dans le transfert horizontal car ils peuvent former des coïntégrats avec d'autres plasmides, être intégrés, en totalité ou partiellement, au chromosome bactérien mais surtout peuvent servir de vecteurs de mobilité pour les transposons et les intégrons.

Figure 22 : structure plasmidique.

III.3.2.2 Les transposons.[15]

Les éléments transposables ou transposons sont définis par un segment d'ADN capable de se déplacer d'une position à une autre sur une molécule d'ADN. Cette translocation, nommée transposition, peut se faire au sein d'une même molécule d'ADN ou entre un chromosome bactérien et un plasmide.
La transposition constitue un mécanisme de recombinaison qui s'effectue en l'absence d'homologie génétique entre l'élément transposable et l'ADN cible. Cette propriété permet d'obtenir des réarrangements génétiques à fort caractère aléatoire et les transposons apparaissent donc comme un moteur évolutif puissant.

Les transposons ne possèdent pas de système de réplication autonome et requièrent donc leurs intégrations au sein d'un vecteur capable de se répliquer pour être maintenus dans la cellule.
Le seul élément commun à tous les transposons est la présence, au sein de leurs structures, d'un gène codant une transposase qui permet d'assurer leurs mobilités.

Il existe une grande variété de transposons qui peuvent être classés selon leurs particularités structurales.

❖ **Les séquences d'insertions (IS)** constituent les éléments mobiles autonomes les plus simples.[16] De petites tailles (de 750 à 2500 pb), elles codent uniquement les fonctions nécessaires à leurs mobilités. Elles présentent également à leurs extrémités de courtes séquences inversées répétées (IR-L et IR-R) qui sont impliquées dans la fixation de la transposase et dans les phases de coupure, d'excision et de transposition. Récemment a été décrit une nouvelle classe d'éléments génétiques mobiles qui présentent une grande similarité avec les séquences d'insertion. Désignés IS*CRs*, ces transposons sont caractérisées par la présence d'un gène codant une transposase-like encadrée, non pas par les deux séquences traditionnelles IR-L et IR-R, mais par des séquences nommées *ori*IS et *ter*IS (pour origine et terminaison de la réplication). Leur mode de transposition diffère clairement de celui des IS puisqu'ils utilisent un mécanisme de « rolling circle replication » [17]

❖ **Les transposons composites,** de taille inférieure à 10 kb, sont constitués de deux IS en orientations directes ou inversées qui encadrent une région centrale composée de différentes gènes autres que ceux requis pour la transposition (Ex : gènes de résistances aux antibiotiques) Les IS ont la capacité de mobiliser le segment d'ADN qu'elles encadrent.

❖ **Les transposons non composites ou cointégratifs,** d'une taille pouvant aller jusque 70 kb, sont constitués d'un segment d'ADN composé des gènes nécessaires à la mobilité et de gènes conférant d'autres fonctions. Ce segment d'ADN n'est pas encadré par des IS mais par des séquences inversées répétées de 35 à 48 pb. (IR-L er IR-R)

❖ **Les transposons conjugatifs .** Cf. III.3.2.3

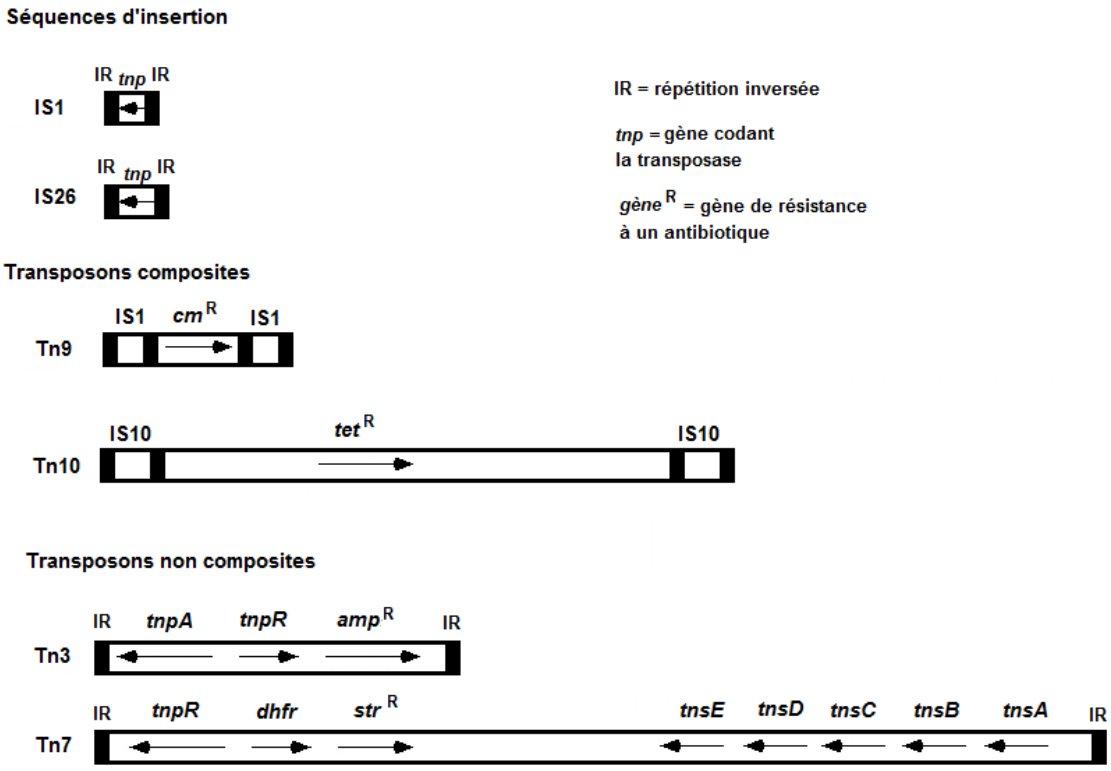


Figure 23 : exemples de transposons

III.3.2.3 Les éléments intégratifs conjugatifs ou mobilisables.[18]

❖ Les **ICEs ou éléments intégratifs conjugatifs** représentent un groupe d'éléments génétiques capables de s'exciser du génome pour former un intermédiaire circulaire non réplicatif qui s'auto-transfert par conjugaison vers une autre cellule et qui intègre alors le nouveau chromosome par un phénomène de recombinaison site spécifique.
Les ICEs comporte obligatoirement un gène codant une recombinase site-spécifique qui catalyse l'excision et l'intégration dans le génome. Ils codent également les fonctions nécessaires à la mise en place de l'appareil conjugatif.

❖ Les **IMEs ou éléments mobilisables intégratifs** sont identiques aux ICEs mais ne codent pas les informations nécessaires à leurs transferts. Toutefois, ils peuvent être mobilisés vers une autre cellule en présence d'un élément conjugatif.

❖ Les **transposons conjugatifs (CTn)** présentent les mêmes caractéristiques que les ICEs. On les distingue cependant par la spécificité du site de recombinaison. On pourra

classer dans le groupe des ICEs les transposons conjugatifs qui ont une spécificité étroite pour le site de recombinaison.

III.3.2.4 Les intégrons.[19, 20]

Les intégrons sont des structures génétiques constituées de deux segments conservés encadrant une région centrale dans laquelle va pouvoir être « capturées » des cassettes de gènes.
Les cassettes de gènes représentent de petites structures d'ADN circulaires de moins de 2 kb. Sous forme libre, les cassettes de gènes ne peuvent pas s'exprimer en raison de l'absence d'une région promotrice. Elles sont constituées uniquement d'un site spécifique de recombinaison, un élément de 59 pb, associé à un gène unique qui confère, pour la plupart, une résistance à un antibiotique.
L'insertion de la cassette dans l'intégron s'effectue par un phénomène de recombinaison au site *attI* qui se situe entre les deux segments conservés de l'intégron. La région conservée 5' code pour l'intégrase responsable de l'insertion site spécifique de la cassette et présente également une région promotrice qui permet l'expression du gène intégré. La région conservée 3' peut être constituée d'un autre gène conférant un phénotype de résistance aux antibiotiques comme le gène *sulI* responsable de la résistance aux sulfamides.

Les intégrons ont été classés sur la base de la séquence génétique codant pour leurs intégrases. Il existe quatre classe d'intégrons dont la classe 1 est celle qui est la plus représentée parmi les bactéries entériques.

A noter qu'un même intégron peut capturer plusieurs cassettes de gènes. Le terme de « **super intégrons** » a été introduit par Mazel et al en 1998 [21, 22] pour décrire les intégrons ayant incorporé des centaines de cassettes.
Le terme d'**intégron complexe de classe 1** désigne un intégron dont la structure présente un certain nombre d'éléments qui divergent de la structure standard des intégrons de classe1. Les intégrons complexes de classe 1 sont souvent associés à l'insertion d'IS*CR*s suivis d'une copie tronquée d'une séquence conservée 3'. Ils peuvent être également composés de plusieurs intégrons encadrant des gènes additionnels. (Ex : SGI1 cf. IV.2.2)

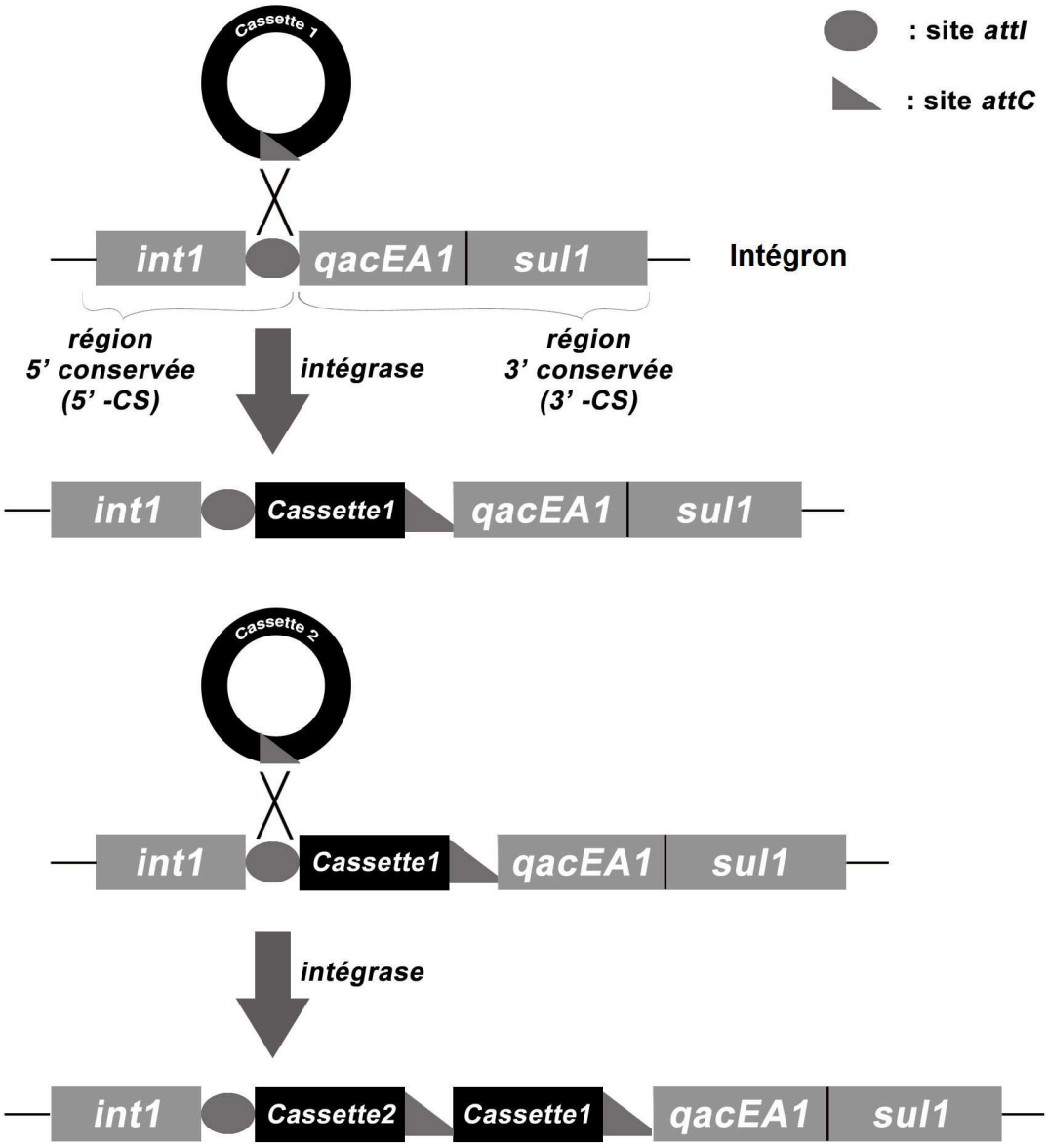


Figure 24 : Intégron et mécanisme de recombinaison.

III.3.3 Pression de sélection et co-transfert.

La plupart des gènes de résistances connus sont portés par des éléments génétiques mobiles décrits dans le chapitre précédent. Lors de l'évolution bactérienne, la capacité des bactéries à exploiter leurs nouveaux environnements et à répondre aux nouvelles pressions de sélection est sans doute plus souvent reliée à l'acquisition de nouveaux gènes par transfert horizontal plutôt qu'à la modification, par mutation, des fonctions de gènes déjà présents dans le chromosome.

Dans les deux cas, les bactéries ayant acquis une résistance ont gagné un avantage considérable qui leur permet de survivre dans un environnement chargé d'antibiotiques. Un avantage qu'elles transmettront aux générations suivantes puisque les résistances acquises sont, le plus souvent, stables et transmissibles. **La pression sélective environnementale favorise donc la génération de populations résistantes aux antibiotiques.**

La présence de bactéries dans le même habitat constitue toutefois un pré requis obligatoire pour le transfert horizontal de gènes qui nécessite un minimum de proximité. Le système gastro-intestinal des humains et des animaux constitue un véritable lieu d'échanges génétiques pour les entérobactéries commensales ou pathogènes, mais également un environnement propice à la sélection des bactéries résistantes en raison de l'utilisation des antibiotiques en élevage ou en médecine humaine. Il représente ainsi un véritable bioréacteur susceptible d'engendrer de nouveaux pathogènes multi-résistants.

Il a été décrit dans le chapitre précédent de nombreux éléments génétiques mobiles capables de porter un nombre important de gènes de résistances. L'association de ces gènes sur un même support pose **le problème de la co-sélection** qui se définit par la sélection de gènes en absence d'une pression sélective directe.

IV. Salmonella Genomic Island (SGI1).

IV.1 Historique [23].

La majorité des infections humaines à salmonelles sont causées par les sérotypes Enteritidis et Typhimurium. Pour le sérotype Typhimurium, le lysotype DT104 est celui qui est le plus souvent isolé chez l'homme. Il a été décrit pour la première fois au milieu des années 1960s mais ne présentait pas alors de résistance aux antibiotiques.
Ce n'est qu'au début des années 1980s, au Royaume Uni, qu'a été isolée de mouettes et d'oiseaux exotiques, des souches *Salmonella* Typhimurium DT104 multi résistantes aux antibiotiques. Une petite épidémie due à ces souches s'était produite en Écosse au milieu des années 1980, puis aucun isolement n'a été décrit jusqu'en 1989. A cette date et au cours des cinq années suivantes, ces souches sont devenues épidémiques dans le bétail puis chez l'homme dans tout le Royaume-Uni. Elles ont par la suite été isolées de volailles, moutons, porcs et chevaux.

Depuis les années 1990s, le lysotype DT104 multirésistant a émergé comme un problème majeur mondial de santé publique qui touche à la fois les hommes et les animaux. Il connait, d'une part, un beau succès épidémique puisqu'il s'est largement propagé à travers le monde causant un nombre important de toxi-infections alimentaires [24-27]. D'autre part son phénotype de multirésistance le rend d'autant plus dangereux que les traitements antibiotiques se révèlent souvent inefficaces notamment lorsqu'ils sont fait sans antibiogramme préalable, ce qui est le cas le plus courant.
Plusieurs études avaient conclu que l'épidémie à *Salmonella* Typhimurium DT104 n'était causée que par un seul clone qui s'était propagé dans les pays d'Europe et aux Etats-Unis [28-30]. Cependant, Markogianiannakis et al. ont décrit six différents clones présents parmi des souches de *Salmonella* Typhimurium DT104 isolées en Grèce [31]. Une autre étude confirme que le phénomène épidémique n'est pas causé par un seul clone qui se serait propagé à travers le monde mais par un groupe restreint composé de quatre clones nommé DT104, DT104a, DT104b et U302.

Les souches DT104 présentent un phénotype de résistance à plusieurs antibiotiques appartenant à cinq familles différentes incluant l'**ampicilline-amoxicilline**, le

chloramphénicol-florfenicol, la **streptomycine-spectinomycine**, les **sulfamides** et la **tétracycline** (**phénotype ACSSuT**). Les gènes de résistance, responsables du phénotype ACSSuT, sont portés par un élément génétique situé au niveau chromosomique nommé **SGI1, *Salmonella* Genomic Island 1.**

Contrairement à d'autres sérotypes, *Salmonella* Typhimurium DT104 est largement distribué au sein des populations animales utilisées en alimentation humaine, comme les bovins, les ovins, les volailles et les porcs. L'acquisition de sa multirésistance a sans doute été favorisée par sa nature zoonotique et une pression de sélection crée par l'utilisation d'antibiotiques dans le milieu vétérinaire, puisque dans le phénotype ACSSuT, quatre des cinq familles représentées sont utilisées couramment en médecine vétérinaire.

IV.2 Structure de SGI1. [32, 33]

IV.2.1 Organisation génétique globale de SGI1.

SGI1 est un élément génétique chromosomique inséré à l'extrémité 3' du gène *thdf* codant pour l'oxydation du thiopène et du furane. Chez les souches de sérovar Typhimurium, SGI1 est suivi du gène *int2* appartenant à un retronphage, lui-même suivi du gène *yidY*. Chez les autres sérovars, le retronphage étant absent, SGI1 est directement suivi du gène *yidY*. A noter que SGI1 est encadré par deux répétitions directes de 18 pb.

Salmonella Genomic Island 1, d'une taille approximative de 43 kb, est constitué de 44 cadres ouverts de lecture (ORF : open reading frame) qui ont été nommés de S001 à S044. L'utilisation d'outils bioinformatiques a permis d'identifier certaines ORFs en se basant sur des homologies de séquence avec d'autres gènes connus. Ces ORFs peuvent être classées dans sept groupes principaux :

- Les ORFs impliquées dans la **recombinaison** de l'ADN : S001, S002, S020, S027, S028, S036, S037 et S043.
- Une ORF impliquée dans la **réplication de l'ADN** : S003.
- Les ORFs impliquées dans le **transfert conjugatif** : S005, S011, S012, S023, S024 et S026.
- Les ORFs impliquées dans les phénomènes de **régulation** : S004, S006, S007, S033 et S035.

- Les ORFs impliquées dans la **résistance aux antibiotiques** : S029-32, S034 and S038-40.
- Les ORFs impliquées dans d'**autres fonctions** : S025 and S026.
- Les ORFs de **fonctions inconnues** : S008-10, S013-19, S021-22, S041-42 et S044.

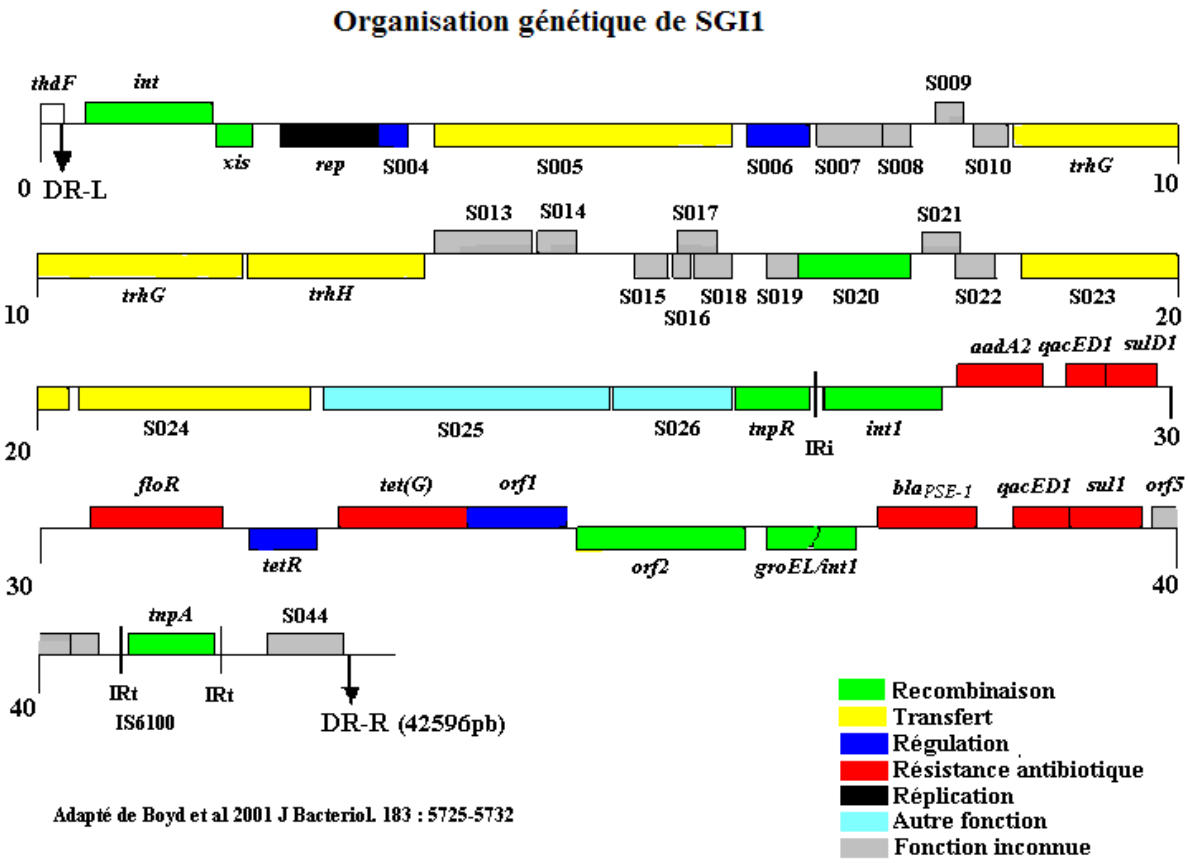


Figure 25 : Structure génétique de SGI1

IV.2.2 L'intégron In104.

Tous les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques sont situés sur une région de 12.5 kb : la région de multirésistance aux antibiotiques (**MDR region: multi-drug resistance region**). Ce locus de multirésistance, nommé récemment **In104**, constitue un intégron complexe de classe 1 appartenant à la famille In4. Cette famille est caractérisée par la présence de deux répétitions inversées encadrant l'intégron et la présence de l'élément *IS*6100 directement suivi d'une copie partielle de ce même élément. L'intégron In104 possède bien ces caractéristiques puisqu'il est encadré de deux répétitions inversées de 25 pb nommées IRi

et IRt et possède un segment conservé 3' qui inclue une copie de *IS*6100. [34-36] Il ne possède cependant pas la copie partielle de l'élément *IS*6100.

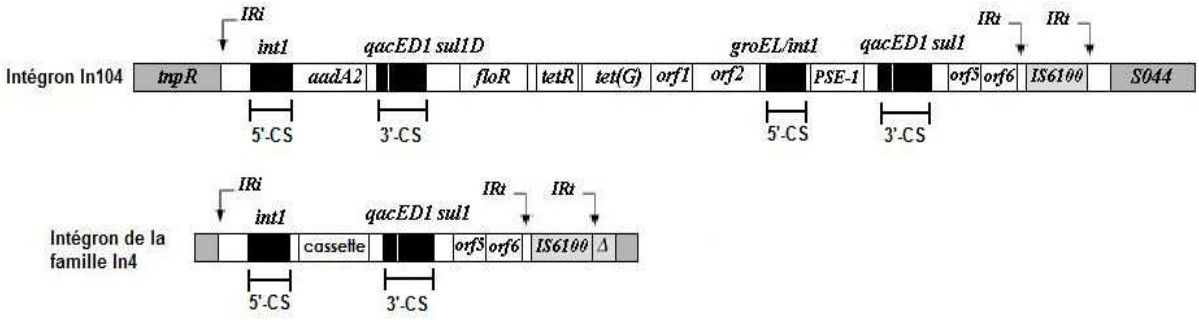


Figure 26 : Représentation schématique de la structure génétique de l'intégron complexe in104 appartenant à l'îlot SGI1, et de la structure classique des intégrons de la famille In4. IRi et IRt sont les répétitions indirectes encadrant l'intégron. Les séquences conservées 5'CS et 3'CS sont notées par des rectangles noirs. Δ correspond à une copie tronquée de l'élément IS6100.

L'intégron complexe In104 est constitué de deux sites *attI1* dans lesquels se sont insérées des cassettes portant chacune un gène de résistance aux antibiotiques. Au premier site a*ttI1*, s'est intégrée une cassette portant le gène *aadA2* qui confère une résistance à la **streptomycine** et à la **spectinomycine**. En aval du gène *aadA2*, se trouve le segment conservé 3' (3'-CS) comprenant un gène *sul1* tronqué (*sul1*Δ). Au deuxième site *attI1,* se trouve une cassette portant le gène bla_{PSE-1} qui confère une résistance à l'**ampicilline**. Il est suivi du segment conservé 3', comprenant un gène *sul1* intact qui confère une résistance aux **sulfamides**. Entre ces deux cassettes, se trouve une région comprenant, entre autres, le gène *floR* qui confère une résistance croisée au **chloramphénicol** et au **florfenicol** et les gènes *tetR* et *tet(G)* conférant une résistance à la **tétracycline**.

IV.2.3 Origine moléculaire de SGI1

Quelle est l'origine de SGI1 et notamment de sa région MDR ?

On peut penser que la région MDR était initialement composée d'un seul intégron auquel se serait ajouté, soit un deuxième intégron comprenant la partie *floR/tet(G)/orf1/orf2/groEl* comme séquence conservé 3', soit un deuxième intégron suivi par une intégration de la région *floR/tet* entre les deux intégrons.

Dans les deux cas, le tronquage des gènes *sul1* et *intI1* serait le résultat de l'intégration de la région *floR/tet.*

En sus des répétitions inversées, la région MDR est également encadrée par des répétitions directes de 5 pb qui laissent supposer sa probable intégration au sein de SGI1 via un phénomène de transposition.

Les gènes *aadA2*, bla_{PSE-1} et *sulI* trouvent probablement leurs origines parmi les entérobactéries dans lesquels ils sont largement distribués. Cependant il est peu probable que les gènes *floR* et *tet(G)* de SGI1 proviennent d'entérobactéries. Les pourcentages en G+C de ces gènes présentent une homologie à 58%, ce qui laisse supposer leur origine commune.

Deux hypothèses peuvent être émises :

- Le florfenicol est un antibiotique qui a été utilisé en aquaculture en Asie depuis le début des années 1980s. Son utilisation a sans doute favorisé l'émergence de résistance au florfenicol par les bactéries des poissons puisque le gène *floR* a été pour la première fois identifié sur un plasmide chez *Photobacterium damselae subsp.piscida* (anciennement nommé *Pasteurella piscicida)*, un pathogène de poissons [37]. Quant au gène *tet(G)*, il a également été identifié pour la première fois chez un pathogène de poisson, *Vibrio anguillarum[38],* mais il a également été décrit sur un plasmide chez *Photobacterium damselae [39]*. L'hypothèse admise est que les gènes *tet(G)* et *floR* proviennent du milieu aquacole et aient été transmis à des bactéries d'origine bovine via un transfert horizontal [40]. Cette hypothèse est étayée par la présence sur SGI1 de séquences d'ADN entourant les gènes *floR* et *tet(G)* qui sont homologues à des séquences d'ADN retrouvées sur les plasmides décrits chez *V. damsela* et *P.piscicida*. Des recombinaisons intermoléculaires ont ainsi permis la diffusion du gène *floR* qu'on retrouve chez différents pathogènes bovins incluant *E.coli [41, 42], S.*Typhimurium DT104 (sur SGI1) [42, 43] et *Pasteurella multocida* [44].

- La deuxième hypothèse serait que ces gènes proviennent de *Pseudomonas spp*. chez lequel le gène *tet(G)* a déjà été décrit [45]. Le gène *floR* n'y a jamais été identifié, cependant il présente une grande similarité avec le gène *cmlA* de *Pseudomonas aeruginosa* [46]. En outre, le gène bla_{PSE-1}, est également retrouvé chez des isolats de *P.aeruginosa* provenant

d'hôpitaux. Une transmission horizontale des gènes *tet(G)* et *floR* à partir de bactéries nosocomiales est donc à supposer [47].

IV.3 Evolution moléculaire de SGI1.

Depuis sa première caractérisation chez *Salmonella* Typhimurium DT104, SGI1 a été reporté chez *Salmonella* Typhimurium DT120, chez différents sérovars de *Salmonella* incluant Agona, Albany, Cerro, Derby, Dusseldorf, Infantis, Kentucky, Kiambu, Meleagredis, Newport, Paratyphi B dT+ et Tallahassee, mais également chez une souche de *Proteus mirabilis*. Les études menées chez ces différentes souches ont permis de caractériser 19 variants de SGI1 notés SGI1-A à SGI1-S [48-66] (cf. Annexe)

Les variants décrits présentent tous des modifications se situant au niveau du locus de multirésistance In104. Les intégrons sont des structures dynamiques qui permettent l'intégration de nouveaux éléments génétiques.

L'excision de cassettes et leurs remplacements par d'autres peuvent expliquer l'origine de certains variants. (Ex : SGI1-F, SGI1-H).

Les **recombinaisons homologues intra ou inter moléculaires** jouent également un rôle important. Des recombinaisons peuvent se produire entre SGI1 et un plasmide co-résidant dans la cellule ou, entre deux éléments portés par SGI1.

In104 étant un intégron complexe, il possède deux structures type « intégron » identiques situés non loin l'une de l'autre. Ce qui permet des crossing over entre les gènes *int* d'une part, et les gènes *qacED1 sul1* d'autre part, conduisant à la délétion de toute une partie du locus (Ex : SGI1-C, SGI1-B).

A cela s'ajoute les phénomènes de **transposition** suivis ou non de recombinaisons intramoléculaires qui conduisent à l'acquisition ou à la délétion d'éléments génétiques. (Ex : SGI1-E, SGI1-A, SGI1-D)

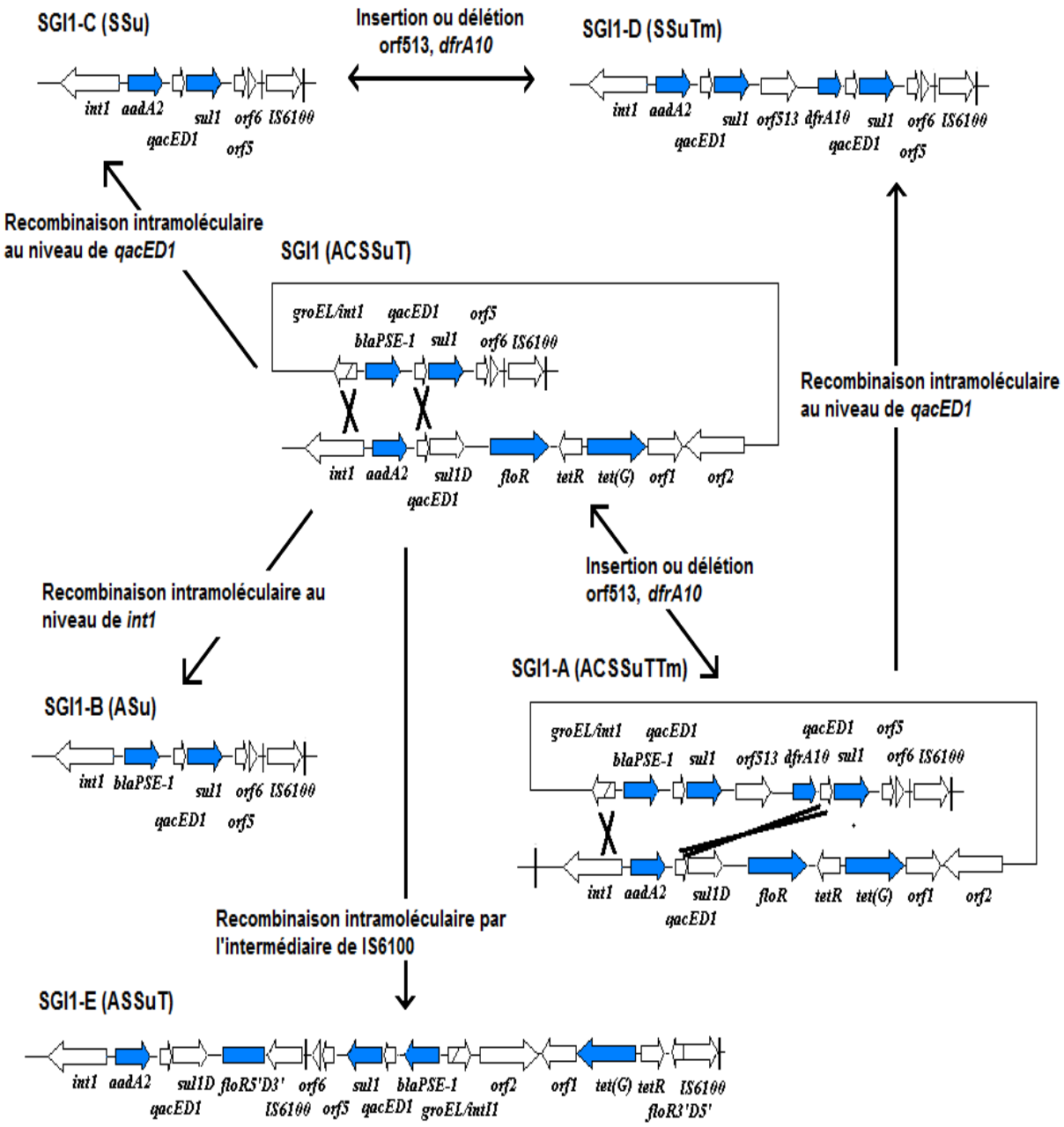


Figure 27 : Quelques exemples de variants SGI1.

Ainsi, SGI1 présente tout une région très dynamique qui présente une capacité d'évolution importante. La majorité des salmonelles multirésistantes isolées présentent une pentarésistance avec le phénotype ACSSuT. L'évolution moléculaire de SGI1 a conduit à la perte ou à l'acquisition de nouveaux éléments génétiques entrainant la perte de résistance, dans certains cas, mais entrainant surtout l'acquisition de résistances supplémentaires comme les résistances au **triméthoprime**, à la **gentamicine** ou à la **kanamycine.** Certaines souches peuvent présenter un phénotype de résistance allant jusqu'à sept antibiotiques.

IV.4 Mobilité de SGI1.

IV.4.1 SGI1 : un élément mobile intégratif (IME)

En 2005, Doublet et al démontre que **SGI1** est un **élément mobile intégratif** (IME).[67]

Plusieurs éléments laissaient supposer la nature mobile de SGI1.

- Tout d'abord, l'identification de SGI1 chez *Proteus mirabilis*, chez différents sérovars de *Salmonella*, et même chez différents clones de *Salmonella* Typhimurium démontre la transmission horizontale de *Salmonella* Genomic Island 1.
- Chez *Salmonella,* SGI1 a toujours été retrouvé inséré au niveau du site *thdf.* Ce qui laisse supposer une intégration au sein du chromosome par le biais d'un phénomène de recombinaison site spécifique.
- SGI1 est encadré par des répétitions directes de 18 pb, DR-L et DR-R. Chez un sérovar de *Salmonella* donné, la répétition directe droite est identique aux dernières 18 pb du gène *thdf* des souches ne portant pas SGI1. La répétition gauche, quant à elle, est identique chez tous les sérovars et provient sans doute du donneur de SGI1. Ce qui appuie l'hypothèse d'une intégration par recombinaison.
- SGI1 possède plusieurs ORFs présentant des homologies avec des gènes impliqués dans le transfert conjugatif.
- En aval de la répétition directe gauche DR-L, SGI1 présente un gène codant pour une putative intégrase (*int*), suivi d'un gène codant pour une putative excisionase (*xis*). Ce qui indique un potentiel de transfert horizontal.

La mobilité de SGI1 a été mise en évidence par Doublet et al en 2005 [67]. SGI1 possède la capacité de s'exciser du génome et de former un intermédiaire circulaire extrachromosomique. Cette excision est assurée par une intégrase codée par le gène *int* de SGI1. L'intermédiaire circulaire est formé par une recombinaison spécifique entre les deux répétitions directes de 18 pb encadrant SGI1. Il peut être alors transféré vers une autre cellule par conjugaison. SGI1 ne possédant pas la capacité d'auto-transfert, sa mobilisation nécessite la présence d'un plasmide conjugatif « helper » (plasmide IncC R55, [68]) qui permet la mise en place de l'appareil conjugatif. Après transfert vers une autre cellule, SGI1 peut intégrer le chromosome par un processus de recombinaison site spécifique, entre le site attP, qui

correspond à une séquence de 18 pb présente sur la forme circulaire de SGI1, et le site d'attachement attB, qui correspond à 1a séquence de 18 pb présente à l'extrémité 3' du gène chromosomique *thdf*.

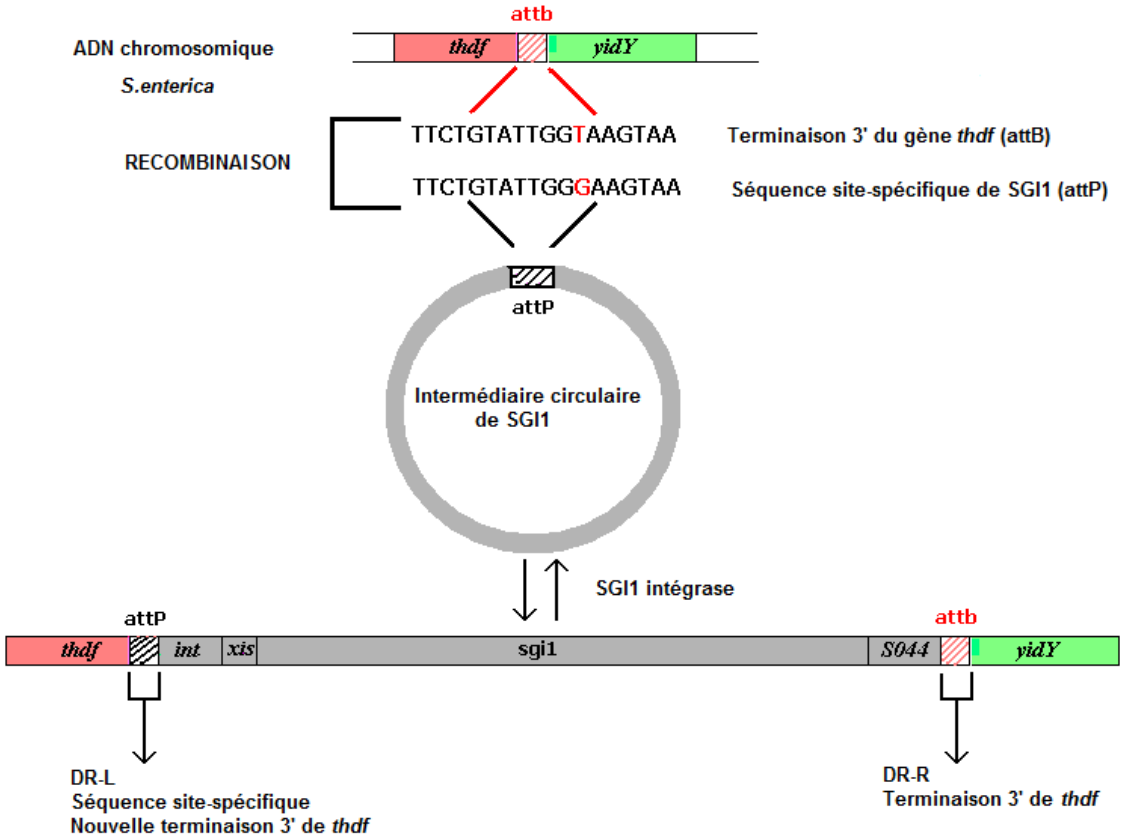


Figure 28 : SGI1, un élément mobilisable intégratif.

SGI1 est ainsi transféré vers une autre cellule en présence de fonctions conjugatives additionnelles fournies en *trans*. Il n'est pas autotransmissible mais mobilisable. C'est pourquoi, il a été classé dans la catégorie des **éléments mobilisables intégratifs (IME)**

IV.4.2 Second site d'intégration de SGI1 et formation d'aires de tandem SGI1.

Récemment, il a été montré que SGI1 possède également la capacité de s'intégrer dans le chromosome au niveau d'un second site d'attachement attB qui se situe entre les gènes *sodB* et *purR* de *Salmonella* [69]. Des expériences de conjugaison ont montré, qu'en absence du gène *thdf*, SGI1 s'intégrait au niveau de ce second site attB. Cependant, pour 43% des souches contenant toujours le gène *thdf*, l'intégration de SGI1 se produisait au niveau des

deux sites attB. A noter que l'étude réalisée par Doublet et al a permis de mettre en évidence l'intégration de plusieurs copies de SGI1, organisées en tandem, au niveau de l'un ou l'autre des sites attB.

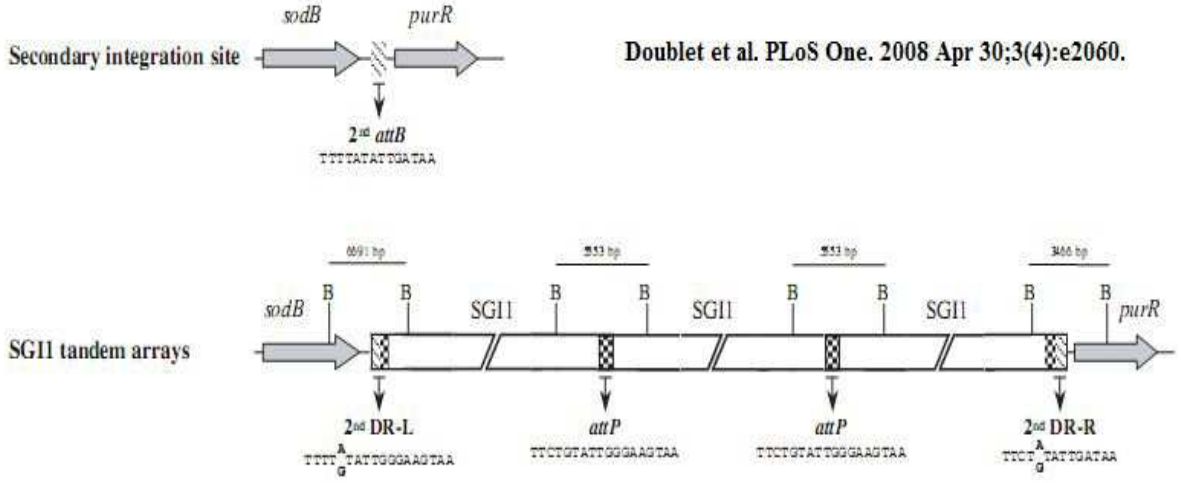


Figure 29 : Aires de tandem SGI1. Représentation schématique du second site d'intégration attB de SGI1 entre les gènes chromosomiques sodB et purR. L'intégration de tandem de SGI1 (3 copies) est représentée.

Le nombre de copies de SGI1 détectées dans des cellules issues d'une même colonie peut être très variable et peut être de l'ordre de deux à six répétitions. Cette hétérogénéité est sans doute due à une dynamique moléculaire au niveau des aires de SGI1. Il est possible que des recombinaisons homologues entre les différentes copies de SGI1 puissent conduire à la délétion d'une ou plusieurs copies de SGI1. Il se peut également que l'intégrase, codée par SGI1, puisse permettre l'excision d'une ou plusieurs copies de SGI1 par recombinaison impliquant les répétitions DR-L ou DR-R avec un site attP interne à l'aire de tandem, ou impliquant deux sites attP internes. Chacune de ces recombinaisons conduit à la formation de l'intermédiaire SGI1 circulaire qui peut être, soit « dilué » lors des différentes divisions cellulaires, soit intégré dans le chromosome de la même cellule au niveau de l'un ou l'autre des sites attB, soit transféré à une autre cellule etc…

SGI1 peut être considéré comme un élément non réplicatif puisqu'aucune origine de réplication n'a été identifiée au sein de sa structure. Ceci ne limite pas sa propagation puisqu'inséré dans le génome, il est transmis verticalement à la descendance et sa mobilité lui permet d'être diffusé parmi différentes espèces bactériennes.
Jusqu'à aujourd'hui, SGI1 n'a été décrit que chez différentes souches de salmonelles et chez *Proteus mirabilis.* Toutefois, des expérimentations in vitro ont démontré la capacité de SGI1 à

s'intégrer dans le génome d'*Escherichia coli* au niveau du gène *thdf*. Il est donc permis de supposer que SGI1 ait la capacité de se propager à différentes espèces bactériennes portant soit le gène *thdf*, soit le gène *sodB* mais également aux espèces portant des sites attB proches de ceux déjà décrits.

IV.5 Problèmes posés par SGI1.

Les caractéristiques de SGI1, décrites dans les chapitres précédents, mettent en avant la problématique importante posée par la diffusion de SGI1 associée à son évolution moléculaire.

Du fait de son intégration dans le chromosome, SGI1 est une **structure stable** dont le maintien dans une souche ne sera pas modulé par la présence d'antibiotiques dans son environnement. Son intégration dans le chromosome assure également sa **réplication** et sa **transmission à la descendance**.

La présence de plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques sur un support commun pose deux problèmes majeurs. Tout d'abord, SGI1 confère un phénotype de résistance à des antibiotiques appartenant à cinq familles différentes augmentant ainsi la probabilité d'**échec thérapeutique** lors d'infections par ces souches multi-résistantes. Ensuite, la pression de sélection exercée par un seul des antibiotiques dont le gène de résistance est porté par SGI1 conduira à la sélection et à la propagation de tous les gènes de résistance présents sur SGI1 : c'est le **phénomène de co-sélection**.

Il a été décrit, dans le chapitre IV.3, la capacité importante d'évolution moléculaire de SGI1. Un des risques majeurs associé à l'évolution de SGI1 est **l'acquisition de nouvelles résistances**. Les pressions de sélections crées par la présence d'antibiotiques sont sans doute à l'origine de l'acquisition par SGI1 de nouveaux gènes de résistance.
Prenons pour exemple l'origine du gène *floR*. Il proviendrait du milieu aquacole dans lequel la sélection et la propagation du gène *floR* aurait été favorisé par l'utilisation, dans les années 1980s, de florfénicol en aquaculture. (cf. IV.2)
Un autre exemple est l'acquisition, par le variant SGI1-F, du gène *dfrA1* qui confère une résistance au trimétoprime. Des séquences présentes sur la cassette portant le gène *dfrA1* sont identiques à celles portées par les intégrons de *V.cholerae* isolées en Thaïlande et en Inde. Le

variant SGI1-F ayant été isolé de poissons exportés de Thaïlande, on peut émettre l'hypothèse que la présence du gène *dfrA1* serait le résultat d'un échange de cassettes entre une souche *Salmonella* et une souche épidémique *V. cholerae*, toutes deux multi-résistantes. La propagation du gène *dfrA1* a sans doute été favorisée par l'utilisation de trimétoprime associé au sulfamethoxazole pour traiter les enfants et les femmes enceintes lors d'une épidémie de choléra en 1982 parmi les khmers.
L'acquisition de nouvelles résistances par SGI1 représente une préoccupation importante car il reste peu d'antibiotiques susceptibles d'être utilisés en cas d'infections par une souche multi-résistante portant SGI1.

Dans le chapitre IV.4, il a été décrit le potentiel de mobilisation de SGI1 vers différentes espèces bactériennes. Un risque majeur est la **transmission de SGI1 à d'autres pathogènes** que *Salmonella* Typhimurium DT104. SGI1 a été déjà décrit chez une souche *Salmonella* Paratyphi B mais il est possible qu'on le retrouve dans l'avenir dans d'autres espèces bactériennes pathogènes telles qu'Escherichia *coli, Shigella spp*. ou *Vibrio spp.* qui portent tous un gène *thdf* conservé.

IV.6 Implication de SGI1 dans la virulence.

Comme résumé dans le chapitre précédent, la diffusion de SGI1 associée à son évolution moléculaire pose un nombre important de préoccupations.

Une des questions principales qui se pose concernant SGI1 est de savoir s'il possède la capacité à conférer un phénotype d'hypervirulence aux souches qui le portent. Plusieurs études ont été menées pour tenter de répondre à cette question. Une étude menée par Varma et al. en 2005 montre que les infections causées par des souches *Salmonella* multirésistantes sont associées à une augmentation du taux d'hospitalisation en comparaison avec les infections causées par les souches *Salmonella* sensibles [70]. Ceci confirme les résultats d'autres études qui avaient montré que les infections causées par les souches *Salmonella* résistantes étaient plus souvent associées à des hospitalisations, des septicémies et parfois même à la mortalité [71-73]. Cependant, il n'est pas encore prouvé que cette augmentation du taux de mortalité soit liée à une hypervirulence des souches contenant SGI1. Elle peut simplement être causée par les échecs thérapeutiques engendrés par l'utilisation d'antibiotiques inadéquats.

En dehors des études statistiques, des tests en modèles cellulaires et animaux ont été tentés pour déterminer le rôle de SGI1 dans la virulence [74-76]. Les résultats n'ont pas permis d'associer la multirésistance des souches *Salmonella* à une augmentation de la virulence. Certaines souches DT104 sont apparues même comme étant moins invasives que leurs homologues sensibles [75]. Dans le modèle souris de salmonellose systémique, les souches DT104 multi-résistantes ne semblent présenter ni une augmentation, ni une réduction de la virulence en comparaison avec les souches sensibles ATCC *S.enterica* Typhimurium 14028s [74].

En 2001, Anriany et al. ont émis l'hypothèse que l'incidence croissante de la souche *S. enterica* Typhimurium DT104 dans les cas de toxi-infections alimentaires était associée à une capacité accrue de cette souche à survivre dans des conditions difficiles [77]. L'étude a permis de montrer que les colonies des souches DT104 pouvaient présenter un phénotype rugueux sous certaines conditions de croissance. Or des études précédentes, réalisées sur *Vibrio cholerae*, ont montré que, les souches rugueuses, comparativement aux cellules lisses, présentaient une résistance accrue au chlorine, aux sels, au stress oxydatif mais ont également une capacité accrue à former des biofilms [78-82].

Les souches *S. enterica* Typhimurium DT104 ne peuvent pas présenter de phénotype rugueux lorsqu'elles se trouvent dans le corps humain puisque le phénomène de rugosité n'est obtenu qu'à des températures inférieures à 30 °C. Il requiert, en effet, la coexpression de curli et de cellulose qui constitue une partie importante de la substance exopolymérique entourant les cellules rugueuses [83-85]. Or les curli sont synthétisés en phase stationnaire sous 30°C alors que la cellulose est assemblée seulement à des températures inférieures à 30°C car elle requiert la protéine régulatrice température-dépendante AdrA pour compléter sa biosynthèse [84].

Ainsi, le phénotype rugueux ne confère pas d'hypervirulence aux souches pathogènes mais leur permet, entre deux infections, de survivre en dehors de l'hôte en leur conférant une résistance accrue contre les agressions physicochimiques de l'environnement.

Une des propriétés caractérisant cette résistance est la capacité accrue des souches rugueuses à former des biofilms [85-87]. L'organisation des bactéries en biofilm leur confère des avantages considérables pour lutter contre les agressions extérieures et, par voie de fait, leur permet une dissémination facilitée à travers le monde (cf. V.5)

Les souches *S. enterica* Typhimurium DT104 sont pour la plupart multi-résistantes et portent SGI1. Malcova et al. ont émis l'hypothèse qu'un ou plusieurs éléments génétiques portés par

SGI1 seraient impliqués dans la capacité des souches DT104 à former des biofilms [88]. L'étude réalisée consista à comparer des souches de *Salmonella* Typhimurium environnementales avec ou sans SGI1 pour leurs efficacités à former des biofilms. Les résultats ont permis de conclure que SGI1 avait bien un effet positif dans la formation de biofilm chez *S*.Typhimurium. Il faut cependant relativiser ce résultat car la comparaison effectuée a été réalisée sur des souches non isogèniques pour lesquelles la production basale de biofilm peut être différente.
Ainsi, d'autres études semblent nécessaires afin de conclure sur le rôle de SGI1 dans la formation de biofilm et plus globalement dans la virulence.

En résumé, pour expliquer l'apparente « hypervirulence » et le succès épidémique des souches *S*.Typhimurium DT104 multi-résistantes, trois principales pistes sont à explorer :

- Les complications accrues observées lors d'infections par les souches *S*.Typhimurium DT104 multirésistantes sont dues à des échecs thérapeutiques causés par l'utilisation d'antibiotiques inadéquats.
- SGI1 porte un ou plusieurs éléments génétiques qui confèrent, aux souches qui le portent, une virulence accrue.
- SGI1 porte un ou plusieurs éléments génétiques impliqués dans la formation de biofilm qui confèrent, aux souches qui le portent, une résistance accrue aux agressions environnementales.

V. Les biofilms bactériens.

V.1 Définition.

Lorsque l'on parle de bactérie, on pense souvent à une cellule isolée, dite **planctonique**, nageant librement dans l'environnement. Cependant, dans les conditions naturelles, les bactéries vont préférentiellement adhérer les unes aux autres pour former une communauté organisée fixée sur une surface : on parle de **biofilm**. Les **bactéries** constituant le biofilm sont dites **sessiles**.

Les biofilms sont des structures tridimensionnelles constituées de cellules adhérant les unes aux autres, séparées par des canaux et entourées d'une matrice protectrice constituée de **Substances Polymériques Extracellulaires** (les **EPS**). La matrice est constituée d'un mélange de plusieurs composants incluant notamment les polysaccharides, les protéines et les acides nucléiques.

A noter qu'un biofilm peut être constitué d'une seule espèce de bactéries ou de plusieurs espèces différentes. Dans les conditions naturelles, il est beaucoup plus probable de retrouver des biofilms constitués d'espèces microbiennes possédant des capacités métaboliques différentes et capables de coopérer afin d'optimiser l'absorption des ressources environnantes.

V.2 Cycle de développement.

V.2.1 Les étapes de formation du biofilm [89-91].

Le passage de la bactérie planctonique à la formation du biofilm est un processus initié par des contraintes environnementales de nature chimique ou physique (PH, température, osmolalité, concentration en nutriments, en oxygène, en fer). Ce processus nécessite une signalisation intercellulaire génétiquement programmée : le Q**uorum Sensing** (**QS**).

Les bactéries sécrètent dans leur environnement de petites molécules chimiques qui, par un système de détection spécifique, permettront aux bactéries environnantes de « connaitre » la densité cellulaire. Lorsque la concentration de ces molécules dépasse un certain seuil, l'expression génétique de ces bactéries ainsi que leurs comportements se modifient totalement conduisant, entre autres, à la formation de biofilms.

La formation du biofilm se déroule en cinq étapes.

Etape 1. **L'attachement.** En réponse à des signaux environnementaux, les bactéries vont tenter de se positionner sur une surface et de s'y attacher. Cette étape fait intervenir des structures bactériennes nommées **adhésines** dont les principales sont les flagelles et les pili. Cette première phase d'attachement sur une surface est un processus réversible.

Etape 2. **L'attachement irréversible.** La deuxième étape consiste en un attachement irréversible sur la surface. Il est supposé que la transition vers la phase d'attachement irréversible se fait par le biais de signaux environnementaux. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, aucun signal de ce type n'a encore été mis en évidence. L'attachement irréversible nécessite l'intervention d'**adhésines** dites **secondaires.** Les bactéries débutent alors une phase de croissance et de multiplication durant laquelle elles émettent des signaux intercellulaires qui initient la production d'EPS qui permettront de piéger les nutriments et les bactéries alentour toujours sous forme planctoniques.

Etape 3. **Première phase de maturation.** Les colonies agrégées constituent des microcolonies formant un film d'une épaisseur égale à environ 10 µm. Notons que l'agrégation des bactéries gram négatif, dont la surface est chargée négativement, nécessite la neutralisation des forces de répulsions électrostatiques par addition de cations divalents dans le milieu ou dans la matrice.

Etape 4. **Deuxième phase de maturation.** Les colonies forment des macrocolonies d'une épaisseur supérieure à 100 µm. La communauté bactérienne s'organise dans une structure tridimensionnelle constituée de couches bactériennes entourées de la matrice protectrice et séparées par des canaux aqueux formant un réseau de circulation permettant l'approvisionnement des nutriments et l'expulsion des métabolites toxiques.

Etape 5. **La dispersion.** Certaines cellules du biofilm se détachent et retournent à la forme planctonique. Si les bactéries sessiles ne pouvaient se détacher, le biofilm serait un piège mortel car l'apport en nutriment serait, à un moment ou un autre, insuffisant. Les bactéries peuvent être dispersées simplement via un mécanisme passif résultant de paramètres hydrodynamiques. La dispersion peut également être le résultat d'un processus très régulé mettant en jeu de nombreux circuits de détection et de régulation. Les réseaux de signalisations aboutissant à la dispersion des bactéries sont plus ou moins compris mais les

mécanismes même de la dispersion n'ont pas encore été élucidés. Ils mettraient en jeu plusieurs éléments dont des enzymes qui dégraderaient les adhésines, un retour de la motilité, la production de surfactant et la lyse cellulaire.

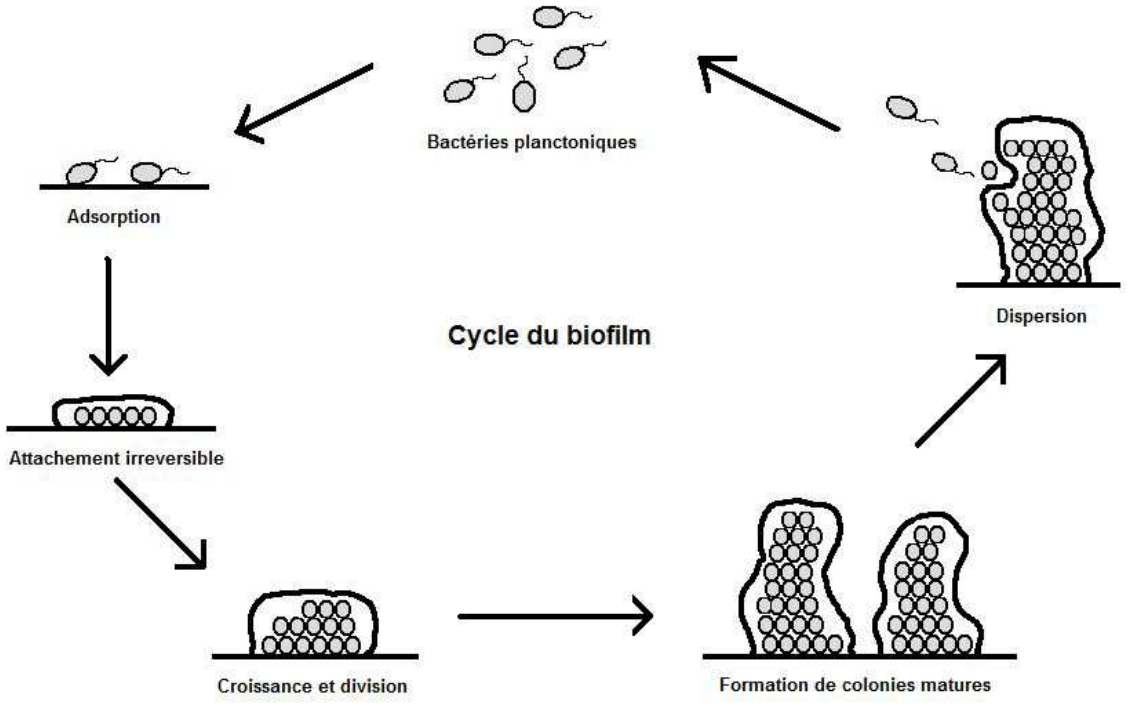


Figure 30 : Les étapes de formation de biofilm.

V.2.2 Eléments impliqués dans le développement des biofilms.[92]

V.2.2.1 les adhésines

Les adhésines incluent une large variété de molécules impliquées dans l'attachement des bactéries aux surfaces. Elles se distinguent en trois classes.

❖ **Les adhésines primaires** sont des protéines extracellulaires capables d'outrepasser les forces répulsives produites par le contact des bactéries avec les surfaces. Les adhésines primaires sont généralement représentées par deux structures impliquées dans la motilité bactérienne : **les flagelles et les pili.** La motilité accélère l'adhésion aux surfaces pour beaucoup de bactéries car elle améliore l'interaction initiale de la bactérie avec la surface en dépassant les forces répulsives

❖ **Les adhésines secondaires** stabilisent l'adhésion initiale et permettent ainsi l'attachement stable et permanent nécessaire à la formation de biofilm. Elles représentent un groupe varié de molécules comprenant les protéines extracellulaires (LapA chez *Pseudomonas fluorescens*), les exopolysaccharides (PGA chez *E.coli*) ou les protéines régulant la motilité (« the swarming motility » chez *Pseudomonas aeruginosa*).

❖ **Les adhésines spécifiques** permettent aux bactéries de s'attacher sur des surfaces particulières. Elles représentent généralement les molécules produites par des bactéries pathogènes pour stabiliser leurs attachements sur les cellules eucaryotes. Dans ce cas, la formation de biofilm constitue un prélude à l'internalisation des cellules bactériennes. (invasin chez *Yersinia pseudotuberculosis,* internalin chez *Listeria*).
Pour exemple, les pathogènes entériques *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica* produisent à leurs surfaces des adhésines nommées invasin qui adhèrent aux β_1 integrin, une glycoprotéine présente sur la surface des cellules épithéliales intestinales, les cellules M. L'interaction des invasin avec les β_1 integrin permet l'internalisation des bactéries à l'intérieur des cellules M, fournissant ainsi un point d'entrée au tissu lymphoïde où *Yersinia* peut proliférer avant de se disséminer.

Chez *Salmonella* Typhimurium DT104, les adhésines primaires semblent être les curli fimbriae et la cellulose. Les curli sont des fibres amyloides et la cellulose est un exopolysaccharide qu'on retrouve très largement dans la nature et qui est capable de créer un réseau avec d'autres polymères carbohydrate. En plus de faciliter l'adhésion aux surfaces, la cellulose fournit une protection mécanique et chimique aux bactéries.
La coexpression des curli et de la cellulose permet non seulement l'attachement aux surfaces mais joue également un rôle dans l'adhérence des cellules les unes aux autres conduisant à la formation de colonies au phénotype rugueux [93].

V.2.2.2 Les EPS.[93]

La matrice extracellulaire renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité. La composition de la matrice est très variable et dépend fortement des espèces constituant le biofilm ainsi que des conditions de culture. Trois grandes classes de substances polymériques extracellulaires ont été étudiées :

❖ **Les exopolysaccharides** représentent les composants majeurs de la plupart des matrices des biofilms. Dans certains cas, la production de polysaccharides est nécessaire pour l'attachement aux surfaces. L'un des exopolysaccharides les plus communs et étudiés est le polymère β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine nommé PGA qu'on retrouve chez diverses espèces bactériennes incluant *E.coli, S. epidermidis, S.aureus, Yersinia pestis.* La cellulose et l'acide colanique sont également des polysaccharides majeurs dans la composition de nombreuses matrices de biofilm.

❖ **Les protéines.**

■ Les **fimbriae** et les **pili** sont des protéines extracellulaires qui confèrent les propriétés adhésives de la bactérie et qui constituent une part importante du biofilm.

■ Certaines **protéines multi-domaines** ont la capacité de promouvoir la formation de biofilm. Chez *S.aureus*, la protéine Bap (biofilm-associated protein) est requise pour la formation de biofilm. Un certain nombre de protéines similaires à *S.aureus* Bap ont été décrites, elles appartiennent à la **famille Bap.** La plupart de ces protéines semblent être ancrées à la surface des cellules ou excrétées dans le milieu. Elles contribuent ainsi au maintien des cellules dans le biofilm en interagissant avec les protéines similaires qui se situent, soit sur la surface colonisée, soit au voisinage des autres cellules bactériennes.

■ Les **lectines** et les protéines liant les sucres facilitent les intéractions cellule-cellule ou cellule-matrice en liant les composants polysaccharidiques de la matrice ou les sucres présents à la surface d'autres cellules.

■ Les **autotransporteurs** sont des protéines capables de se transporter elles-mêmes à la surface cellulaire sans l'intervention d'autres systèmes de transport. Les autotransporteurs représentent une famille de molécules capables de s'associer entre elles, favorisant ainsi les intéractions cellule-cellule qui conduisent à l'agrégation cellulaire.

❖ **L'ADN** constitue une part importante de la matrice extracellulaire. La présence d'ADN dans la matrice peut être expliquée soit par la lyse complète de cellules, soit par la sécrétion hors de la cellule de vésicules contenant de l'ADN. La lyse cellulaire semble être l'hypothèse la plus probable. Plusieurs études chez diverses espèces bactériennes, dont *S.aureus*, ont montré que l'ADN contenu dans la matrice était identique à l'ADN chromosomique. Chez certaines bactéries, comme *P.aeruginosa*, l'ADN semble être nécessaire à la formation de biofilm. Une des hypothèses émises serait que l'ADN servirait de

« grille » qui permet aux bactéries de se mouvoir en utilisant les pili de type IV qui lient l'ADN chez certaines espèces.

Les EPS constituent une grande variété de molécules qui restent à étudier pour déterminer, d'une part, leurs implications dans la formation de biofilm et pour déterminer, d'autre part, si leurs rôles dans le biofilm sont conservés dans différents types de bactéries. Des études récentes suggèrent qu'une même molécule peut avoir des rôles différents selon l'organisme où elle se trouve.

Chez *Salmonella* Typhimurium DT104, trois éléments constituent les composants majeurs de la matrice extracellulaire : les curli fimbriae, la cellulose et le polysaccharide capsulaire.

V.3 L'architecture des biofilms.

Il existe des biofilms dits « monocouches », constitués de cellules isolées adhérant à une même surface ou des biofilms dits « multicouches » constitués de cellules attachées à une surface, adhérant les unes aux autres et entourées de la matrice extracellulaire. Ces derniers sont les plus étudiés.

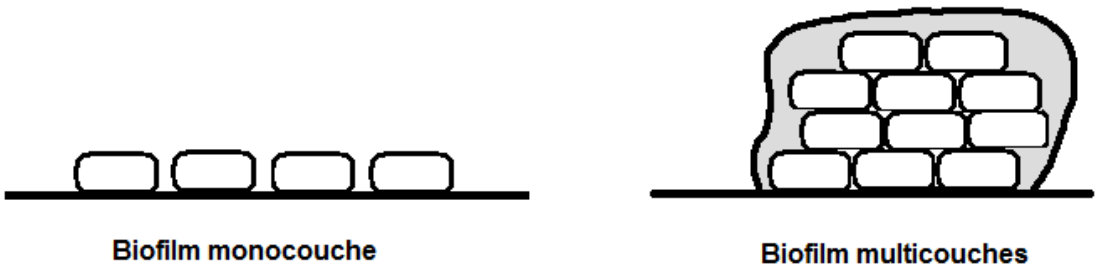


Figure 31 : Deux types de biofilms.

L'architecture d'un biofilm dépend de ' la' ou 'les' espèces le constituant mais une même espèce bactérienne peut former des biofilms différents selon les facteurs environnementaux. Les principaux déterminants responsables de l'architecture du biofilm sont la composition du milieu, la présence de surfactant, le type de motilité mis en place (flagellaire, twitching, swarming), et les effets du quorum sensing. Il existe ainsi une grande diversité des biofilms qui présenteront une robustesse plus ou moins importante vis-à-vis des facteurs physiques ou chimiques. (Ex : sensibilité différente vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène)

Malgré la diversité présente des biofilms, on peut distinguer deux principaux types d'architectures parmi les biofilms multicouches. Le premier est caractérisé par une topologie irrégulière et une structure similaire à un champignon, séparée par des canaux. De la structure dite « en champignon », résulte une faible surface de recouvrement. L'autre type d'architecture est caractérisé par des couches compactes semblables à des feuilles superposées et une forte surface de recouvrement.

V.4 Hétérogénéité du biofilm [94, 95].

Comme présenté dans le paragraphe précédent, les bactéries édifient des biofilms présentant des caractéristiques variées. Mais au sein d'un même biofilm, il existe également une grande hétérogénéité. L'activité métabolique des cellules associée au processus de diffusion à travers les canaux entraine la formation d'un gradient de concentration de nutriments, de métabolites et de molécules signals au sein du biofilm. Les bactéries s'adaptent à ces gradients qui vont évoluer tout au long du développement du biofilm. Certaines études ont montré que, durant certaines étapes de la formation de biofilm, 50 % du protéome des bactéries sessiles pouvait être modifié. De cela, il résulte une hétérogénéité spatio-temporelle tant au niveau de la composition chimique du biofilm qu'au niveau de l'état physiologique des cellules et de leurs bagages génétiques.

V.4.1 Hétérogénéité de la composition chimique du biofilm.

Les biofilms sont des structures tridimensionnelles parcourues par des canaux, comparables à un système circulatoire primitif. Ils permettent l'approvisionnement des nutriments aux bactéries sessiles, le relarguage des métabolites toxiques et l'échange de molécules signal entre les populations microbiennes. La balance dynamique entre la production, la consommation et la diffusion de ces éléments détermine leurs concentrations locales.
Il en résulte des gradients de substrats et de produits. Le gradient oxygène est celui qui a été le plus étudié. La concentration en oxygène et en nutriments est plus importante en surface et diminue au fur et à mesure qu'on avance à l'intérieur du biofilm. En ce qui concerne les produits métaboliques, il s'agit généralement du processus inverse. Cependant, dans les biofilms composés d'espèces différentes, le métabolite d'une espèce peut servir de substrat à une autre. Dans ce cas, la concentration en métabolite peut présenter un pic à l'intérieur du biofilm. Par exemple, dans les biofilms dénitrifiant, le nitrate est réduit en gaz nitrogène en

passant par un intermédiaire nitrite. Le pic de nitrite, localisé au centre du biofilm, est alors 4 fois plus concentré que dans les autres zones.

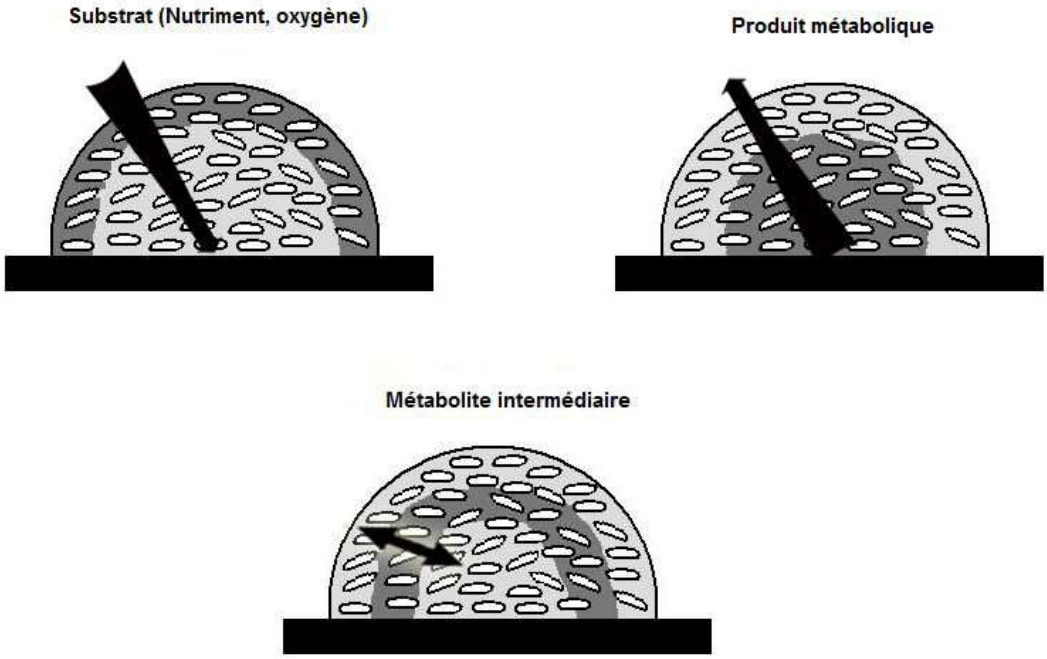


Figure 32 : Hétérogénéité de la composition chimique du biofilm.

Les gradients de concentration sont également valables pour d'autres molécules tels que les accepteurs ou les donneurs d'électrons, les cofacteurs, les antibiotiques etc.

V.4.2 Hétérogénéité de l'état physiologique des cellules.

Les gradients de concentrations décrits précédemment ont pour conséquence une modification du comportement des cellules qui s'adaptent aux conditions chimiques environnantes. Par exemple, l'accumulation de produits métaboliques acides à l'intérieur du biofilm peut réduire le PH local affectant ainsi l'état physiologique des bactéries. De nombreuses molécules ont la capacité d'engendrer des modifications physiologiques.

Au sein du biofilm mature, on peut supposer trois principaux états physiologiques.

- Les cellules situées les plus en surface, sont les plus actives car elles ont un meilleur accès à l'oxygène et aux nutriments. Ces cellules utilisent probablement **un métabolisme aérobie.** A noter qu'elles sont cependant plus vulnérables aux antibiotiques par rapport aux

cellules moins actives situées en profondeur qui sont, en outre, protégées par la matrice extracellulaire.

❖ Plus en profondeur, les cellules ont toujours accès aux substrats mais plus à l'oxygène car il est rapidement consommé. Ici, les cellules ont la possibilité de croitre à l'aide d'un **système fermentatif.** Ce modèle explique comment une bactérie anaérobie peut survivre en biofilm dans un environnement oxygéné. Il nécessite cependant la coopération d'une espèce aérobie.

❖ Enfin, dans la phase la plus profonde, les cellules n'ont plus accès ni à l'oxygène, ni aux substrats. Des cellules meurent sans doute et d'autres deviennent inactives. C'est ici que l'on retrouve les cellules dites « persistantes ».

A noter que la division cellulaire semble être rare dans les biofilms matures et notamment pour les cellules situées en profondeur. Les contraintes spatiales et la présence d'EPS rendent difficiles la multiplication cellulaire. Sous forme planctonique, la bactérie utilise la majorité des nutriments à des fins de multiplication, ce qui ne semble pas être le cas des bactéries sessiles qui concentrent leurs énergies plus probablement pour la production d'EPS.

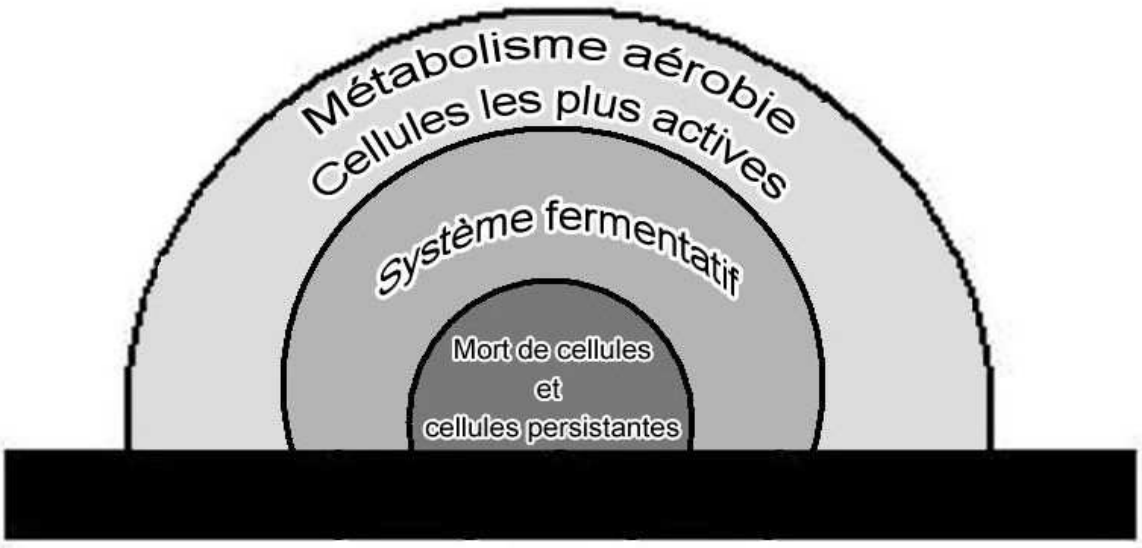


Figure 33 : Hétérogénéité physiologique du biofilm.

Au sein du biofilm, il existe des cellules dites **persistantes** qui représentent environ 1% des cellules [96, 97]. Elles sont identiques, d'un point de vue génétique, au reste des bactéries présentes dans le biofilm mais se distinguent par leur expression phénotypique et notamment par leur résistance aux antibiotiques. Les cellules persistantes sont des **cellules « dormantes »**, qui ne se divisent pas. Lorsqu'une population bactérienne est en présence d'antibiotiques bactéricides, toutes les cellules meurent sauf les cellules persistantes qui seront simplement inhibées. Ces cellules pourront, par la suite, redonner une culture bactérienne constituée de cellules « normales ». Les cellules persistantes sont des cellules altruistes qui abandonnent leurs propagations pour assurer la survie du groupe cellulaire en présence de facteurs létaux.

Elles sont présentes dans toutes les cultures bactériennes, en faible nombre durant la phase logarithmique, et en nombre plus important durant la phase stationnaire et dans les biofilms. Le profil génétique des cellules dormantes est comparable à celui des cellules de la phase exponentielle mais avec une sous régulation des gènes impliqués dans la production d'énergie et des fonctions non essentielles comme les flagelles : d'où le nom d'état dormant.

Les processus de résistance aux antibiotiques sont bien connus mais le mécanisme de M**ultiDrug Tolérance** (**MDT**) des cellules persistantes reste largement inconnu.

Une des hypothèses faite est que des **protéines** dites **MDT** spécifiques se fixent sur les cibles des antibiotiques, leur en privant l'accès. La fixation sur ces cibles entraine une inhibition des fonctions cellulaires associées, mais qui n'est pas létale. Le profil de l'expression génétique des cellules persistantes indique une élévation de l'expression des modules toxin-antitoxin (Rôle protecteur des toxines) et d'autres gènes impliqués dans le blocage de fonctions cellulaires importantes, comme la traduction, qui sont souvent la cible des antibiotiques. Le mécanisme de MDT est donc, sans doute, en relation avec un blocage de l'accès aux cibles des antibiotiques.

La résistance aux antibiotiques des cellules persistantes est responsable de nombreux échecs thérapeutiques et des rechutes. La présence de cellules persistantes au sein d'un biofilm revêt une importance particulière.

Sous forme planctonique, après traitement antibiotique, les cellules persistantes peuvent être détruites par le système immunitaire humain comme n'importe quelle cellule qui ne se multiplie pas. En revanche, les cellules persistantes des biofilms sont protégées par la matrice extracellulaire. Elles ne sont pas phagocytées et repeuplent par la suite le biofilm lorsque l'antibiotique a été dégradé.

V.4.3 Hétérogénéité de leurs bagages génétiques.

L'hétérogénéité phénotypique rencontrée dans le biofilm s'explique par trois phénomènes principaux (cf. Figure 34). D'autres mécanismes peuvent être supposés.

❖ A) Chez certaines espèces, plus de 10 % du génome est composé de gènes régulateurs. En réponse aux gradients chimiques du biofilm, les bactéries régulent leur expression génétique pour s'adapter à leur environnement. Ce qui entraine une modification de leur état physiologique. Cf. paragraphe précédent.

❖ B) Il existe également une sous population de bactéries présentes dans le biofilm qui vont présenter une expression génétique différente. Cette expression se fait de manière totalement aléatoire, ne répondant à aucune condition environnante particulière.

❖ C) Enfin, l'hétérogénéité phénotypique s'explique par l'émergence de variants créés par mutation ou recombinaison intra ou intercellulaires. Ces réarrangements génétiques génèrent des variants dont la propagation sera dépendante de la sélection naturelle au sein du biofilm.

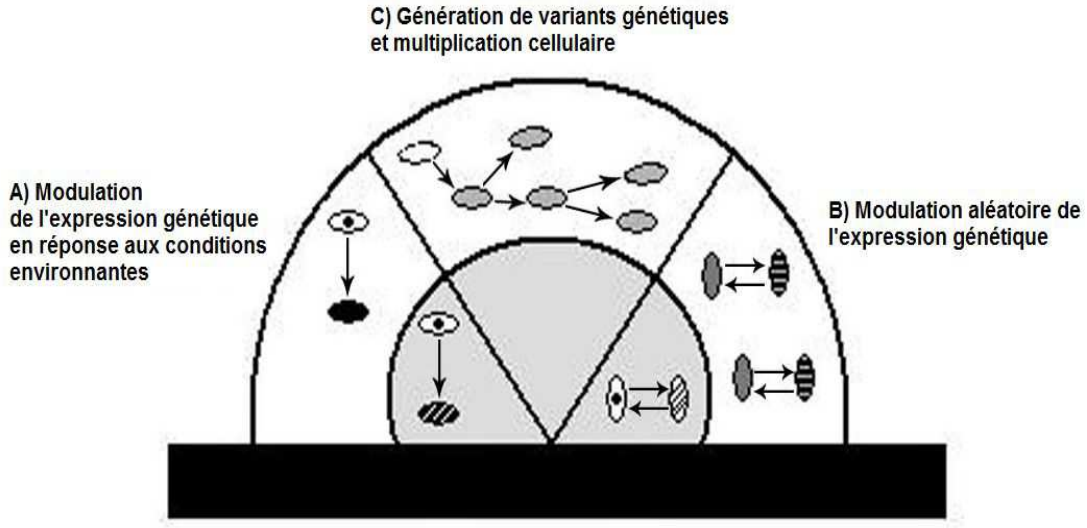


Figure 34 : hétérogénéité génétique au sein du biofilm.

V.5 Génétique du biofilm : Réseaux de régulation.

La formation de biofilm fait intervenir de nombreux gènes régulés par des cascades réactionnelles dans un système très complexe en raison du grand nombre de molécules pouvant interférer dans ces réactions. Dix années de recherche ont permis d'identifier un grand nombre de gènes dont la mutation ou la délétion impactait sur la formation de biofilm à différents niveaux de son cycle de développement. Actuellement, nul n'a pu mettre en évidence un réseau de gènes dédié uniquement à la formation de biofilm. Une hypothèse émise serait que la formation du biofilm serait intégrée dans un réseau de modules de régulation qui ont évolué en réponse à des pressions de sélections.

V.5.1 Le Quorum Sensing [98, 99]

Le quorum sensing, à l'origine de la formation des biofilms, est un processus qui diffère selon les bactéries. Plusieurs systèmes utilisant des signalisations intercellulaires spécifiques ont été décrits. Les systèmes présentés dans les paragraphes ci-dessous ont de nombreuses variantes, selon les bactéries, n'utilisant pas forcément la molécule décrite mais des homologues et des cascades de réactions différentes.

V.5.1.1 Système utilisé majoritairement par les bactéries Gram +. (Et par certains Gram-)

Les bactéries Gram+ utilisent un système fonctionnant avec des oligopeptides comportant des modifications post traductionnelles : **les polypeptides auto-inducteurs (AIPs).** Ils sont composés de 5 à 17 acides aminés avec des chaines latérales variables. Les AIPs sont synthétisés dans le cytoplasme, modifiés puis transportés dans l'environnement extérieur. Lorsqu'une haute concentration d'AIPs est présente dans l'environnement, les bactéries ont la capacité de les détecter entrainant la phosphorylation d'une protéine de régulation qui est ainsi activée. La protéine de régulation a pour cible des promoteurs impliqués dans l'activation de la transcription de différents gènes.

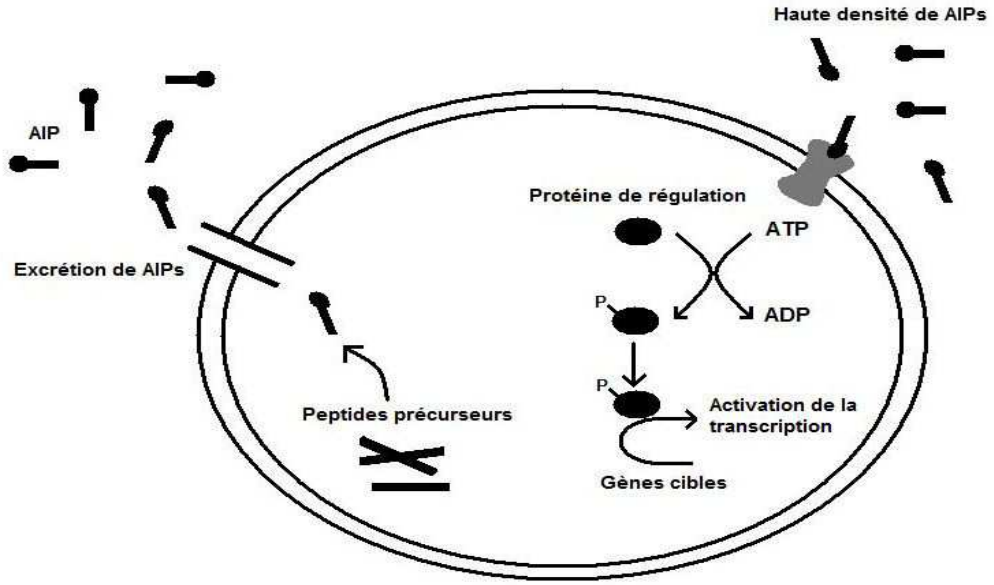


Figure 35 : Quorum sensing, système AIP.

V.5.1.2 Système utilisé par les bactéries Gram - : Lux I/LuxR de Vibrio fischeri.

Dans ce système, la signalisation intercellulaire se fait par l'intermédiaire des **N-acylhomosérine lactones (AHLs)**, également appelés **auto-inducteurs 1 (AI-1)**. Ils sont constitués d'un anneau lactone homosérine sur lequel se greffe une chaine acyl composée d'un nombre variable d'atomes carbones.
Les AHLs à courtes chaines carbonées ont la possibilité de diffuser à travers la cellule bactérienne. Ce n'est pas le cas des AHLs possédant une longue chaine carbonée ainsi que les AIPs qui nécessitent des systèmes de transport actifs pour traverser la membrane bactérienne.

LuxI est une protéine qui joue un rôle majeur dans la synthèse des AHLs. Quand un certain seuil de concentration en AHLs est atteint, elles se lient à une protéine de régulation, LuxR, qui est ainsi activée et qui démarre une régulation de la transcription de gènes. LuxR est spécifique de certaines AHLs, c'est pourquoi le système LuxI/LuxR est utilisé pour une communication intra espèce. Il existe cependant des homologues de LuxR capables de détecter différentes AHLs. (Ex : SdiA de *Salmonella* impliqué dans la communication inter espèce).

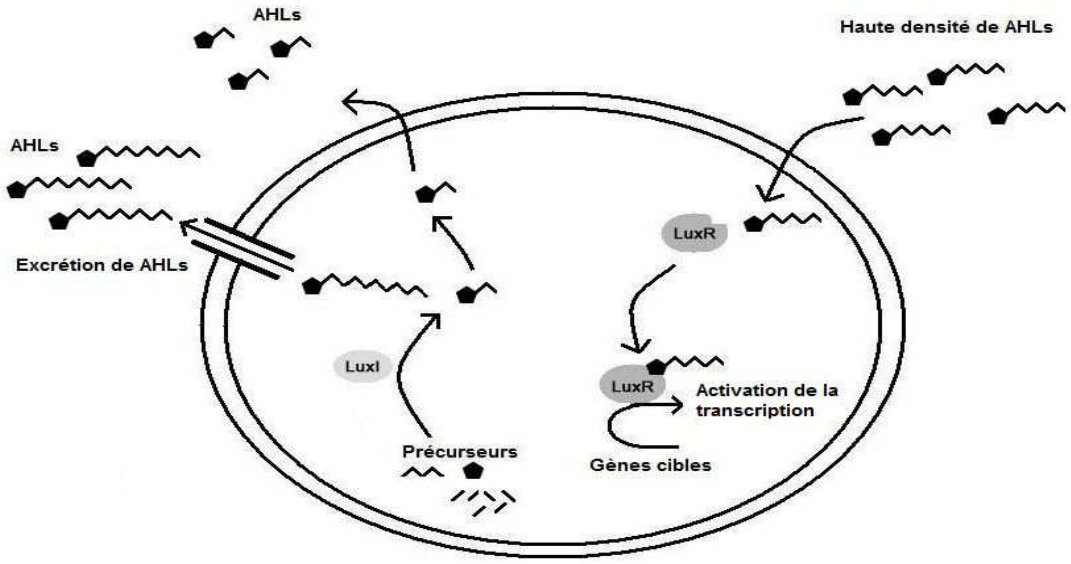


Figure 36 : Quorum sensing, système LuxI/LuxR

V.5.1.3 Système utilisé par les bactéries Gram – et Gram+ : LuxPQ/LuxS de Vibrio harveyi.

Ce troisième système utilise des auto-inducteurs 2 (AI-2), les esters de furanosyl de borate, qui sont synthétisés par l'intermédiaire de l'enzyme LuxS. A haute concentration, les AI-2 sont détectés par une protéine périplasmique, LuxP. Le complexe LuxP/AI-2 se lie à une seconde protéine LuxQ qui est alors « bloquée ». Lorsque la concentration de AI-2 est faible, LuxQ, libre, inactive LuxO en le phosphorylant; ce qui induit la transcription de gènes par l'intermédiaire d'une autre protéine : LuxR (différente de celle du deuxième système)

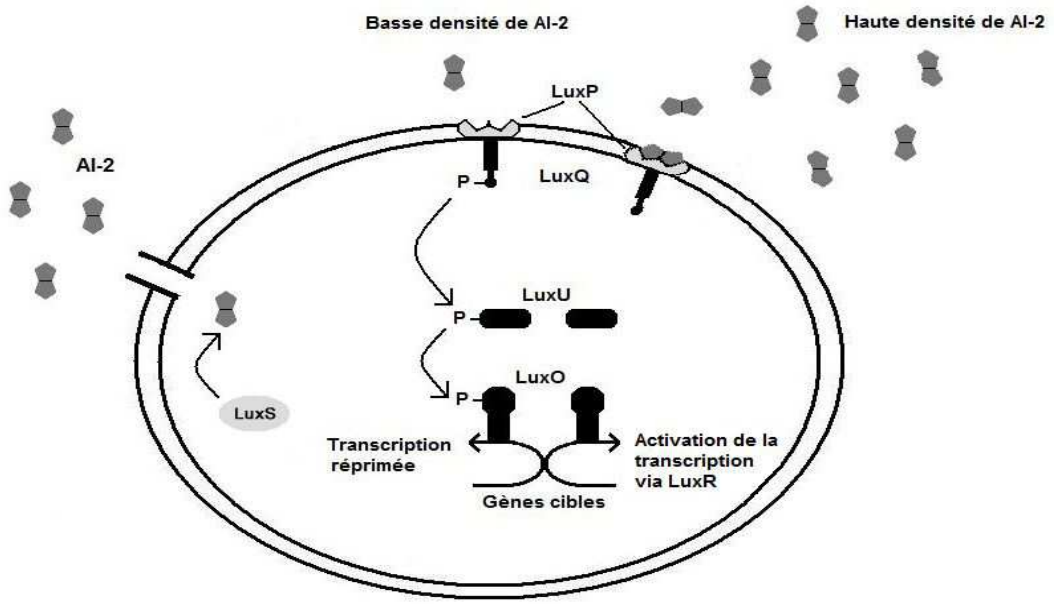


Figure 37 : Quorum sensing, système LuxPQ/LuxS

V.5.1.4 Le système AI-3/épinephrine/norépinephrine.

Ce système utilise les autoinducteurs 3, dits **AI-3** peu caractérisés. Les AI-3 sont produits par de nombreuses bactéries entériques. A haute concentration, les AI-3 se fixent sur des récepteurs appelés QsE/F ou QseB/C activant une régulation transcriptionnelle. Les AI-3 ont probablement une structure homologue à l'epinephrine et la norépinephrine car ces derniers possèdent également la capacité de se fixer sur les récepteurs QsE/F et QseB/C.

Ce système est intéressant car il met en évidence l'interaction qui existe entre les bactéries de la flore intestinale et leur hôte, les mammifères. La flore intestinale est indispensable pour l'absorption des nutriments, pour aider aux défenses naturelles de l'organisme mais elle joue également un rôle dans le développement des intestins. Ici, il est décrit un système mettant en jeu des composés chimiques, l'epinephrine et la norépinephrine, qui constituent des signaux intercellulaires utilisés et par les bactéries, et par les cellules eucaryotes. Ce système peut quelquefois permettre à des bactéries virulentes, comme les EHEC, d'activer des gènes de virulence, de coloniser l'hôte et d'entamer ainsi le processus d'infection.

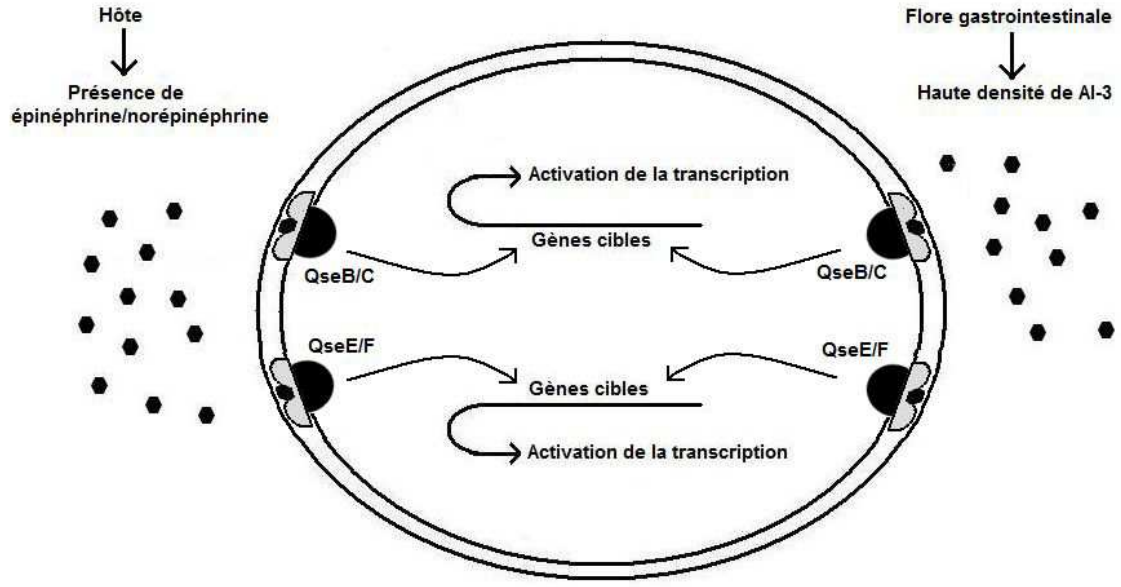


Figure 38 : Quorum sensing, le système AI-3/épinephrine/norépinephrine.

V.5.1.4 Système utilisé chez Salmonella.[100]

Les intestins sont un environnement extrêmement complexe d'un point de vue diversité microbiologique. Les entérobactéries s'y développent et s'y adaptent notamment en utilisant

des systèmes de communication inter espèces. Chez les salmonelles, plusieurs systèmes de Quorum Sensing ont été décrits dont la majorité sont impliqués dans la signalisation inter espèce. (Lux/AI-2, AI-3/épinephrine/norépinephrine/, indole, LuxR homologue SdiA).

- Le système SdiA.

Les salmonelles peuvent mettre en place un système de Quorum Sensing utilisant un homologue de la protéine LuxR : SdiA. En revanche, elles n'ont pas de protéine LuxI ou d'homologues : il n'y a donc pas de synthèse de AHLs. Ceci suggère que la protéine SdiA a la capacité de détecter des AHLs synthétisés par d'autres espèces.

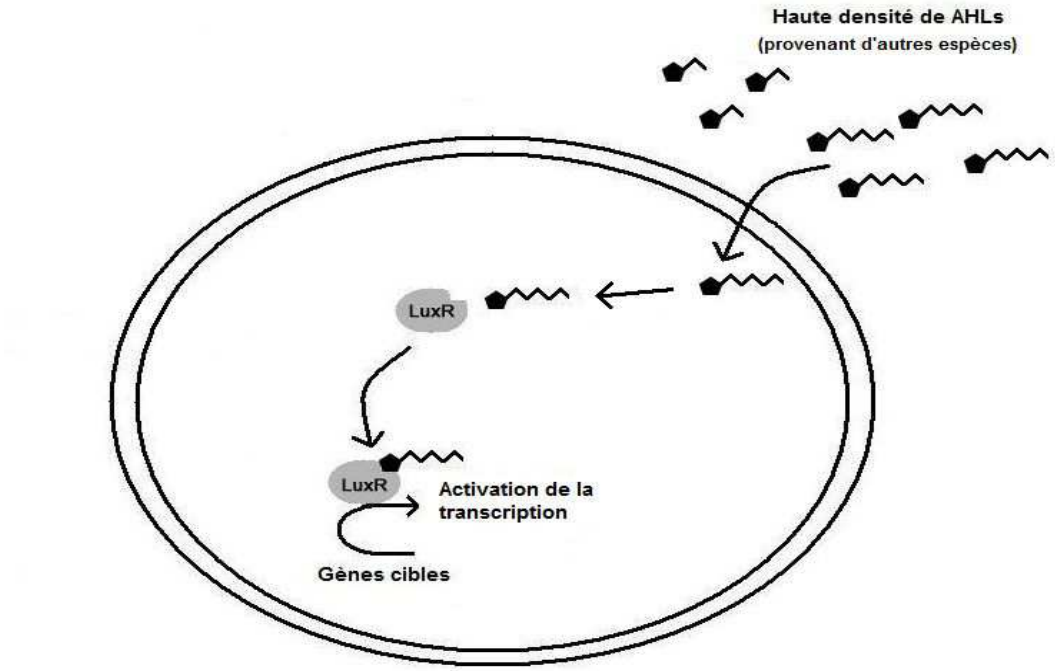


Figure 39 : Le système SdiA de *Salmonella*.

- Le système LuxS/AI-2.

Les salmonelles possèdent l'enzyme LuxS qui synthétise les auto-inducteurs 2. Cependant, la chaine réactionnelle du système LuxS/AI-2 chez *Salmonella* est totalement différente de celle décrite dans le paragraphe précédent (cf. V.4.1.3). Les auto-inducteurs AI-2 sont transportés à l'intérieur de la cellule via une protéine périplasmique (LsrB) et sont modifiés par phosphorylation. Ils interagissent alors avec un facteur de transcription appelé LsrR impliqué notamment dans la répression de l'opéron lsr codant pour un transporteur ABC appelé Lsr (LuxS-regulated) qui permet le transport des auto-inducteurs AI-2 à l'intérieur de la cellule. Il

n'est pas encore clair de savoir si, chez les salmonelles, les auto-inducteurs AI-2 sont des molécules signalétiques ou ont une autre fonction. On ne sait également pas quelles autres cibles de régulation peuvent avoir les AI-2.

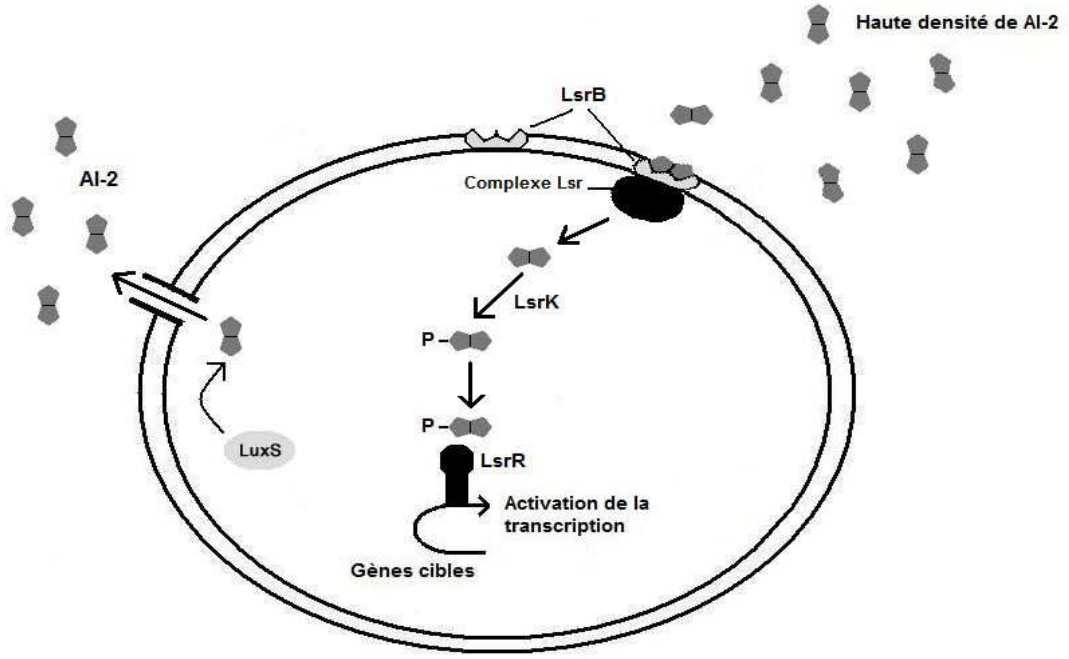


Figure 40 : Le système LuxS/AI-2 chez *Salmonella.*

- Le système AI-3/épinephrine/norepinephrine.

Le système AI-3/épinephrine/norepinephrine de *Salmonella* est identique à celui décrit précédemment dans le paragraphe V.5.1.4.

Il semble que les systèmes de quorum sensing décrits chez salmonelles ne sont en fait que de natures métaboliques plutôt que d'être de « vrais » systèmes de signalisation.

V.5.2 Les messagers secondaires et réseaux de protéines.[92]

De nombreuses connaissances ont été apportées concernant les réseaux de régulation des biofilms. Cependant, beaucoup d'éléments restent encore à comprendre et notamment comment ces réseaux de régulation interagissent.

V.5.2.1 Le c-di-GMP.

Le c-di-GMP est un messager secondaire qui a été décrit, il y une vingtaine d'années, pour son rôle dans l'activation de la synthèse de cellulose impliquée dans l'adhésion initial des bactéries. Plus récemment, il a été montré que ce messager était un régulateur central dans la formation de biofilm ainsi que dans la transition de la forme sessile à la forme motile des bactéries gram négatif.

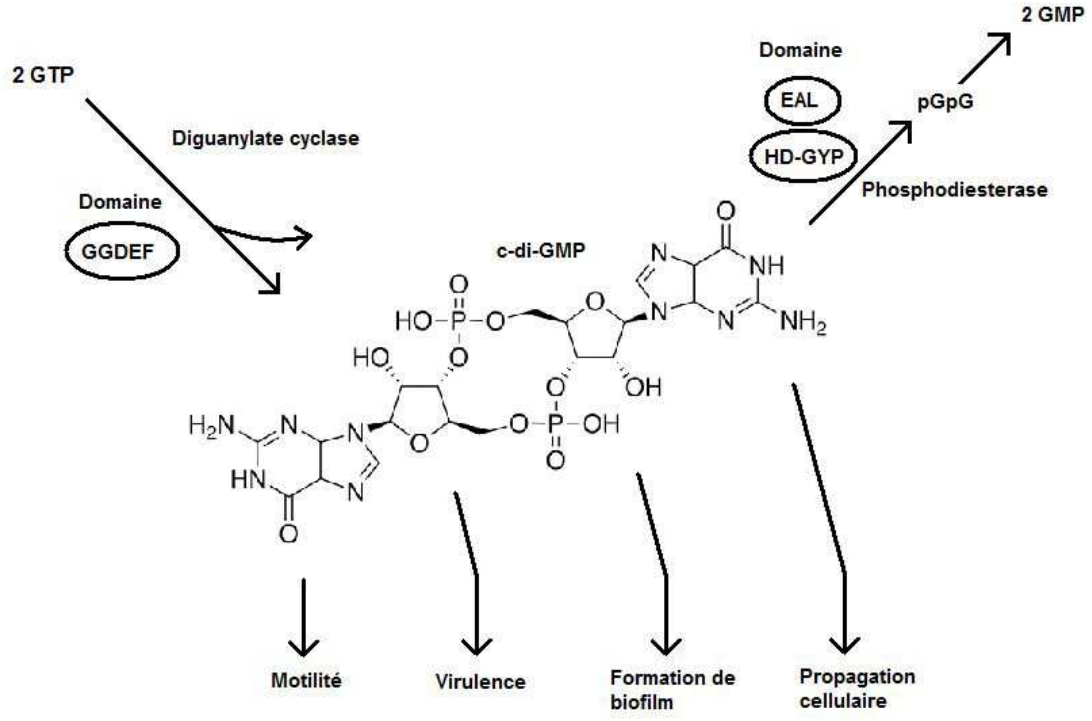


Figure 41 : Rôle du c-di-GMP.

V.5.2.2 Les TCSs. (Two-Components Systems)

Chez les procaryotes, les réseaux de régulation font souvent intervenir le transfert d'un groupe phosphoryle. Ce mécanisme est le principal utilisé pour recevoir les informations provenant de l'environnement. Comme leur nom l'indique, les TCSs sont des systèmes composés de deux structures : un capteur « histidine kinase » qui détecte les signaux extérieurs et un régulateur qui, phosphorylé par la kinase, s'active et induit une réponse qui peut être une répression ou une activation de gènes. Dans la réalité, ce système n'est pas aussi simple. Des complexes protéiques peuvent se former, et les signaux extérieurs peuvent être transmis par une chaine réactionnelle complexe.

V.5.2.3 Les régulateurs transcriptionnels isolés.

Une majorité des régulateurs transcriptionnels impliqués dans la formation de biofilms sont activés ou réprimés via les cascades réactionnelles impliquant le c-di-GMP ou les TCSs. Cependant, chez certaines bactéries, il est possible de trouver des régulateurs différents qui ne font pas partis de ces réseaux (CytR chez *V.cholerae* et *E.coli*, LeuO chez *V.cholerae*, NhaR chez *E.coli*)

V.6 Biofilm et virulence.

V.6.1 Les biofilms : problèmes posés.

Les biofilms sont d'une importance majeure en médecine humaine et vétérinaire. Capables de coloniser de nombreuses surfaces utilisées par l'homme comme, entre autres, les tuyauteries, les cathéters et les implants médicaux, ils sont **sources de nombreuses infections**. 65 % des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms. (cf. Tableau 3). L'organisation en biofilm permet aux bactéries de diviser le 'travail' et d'avoir ainsi un **métabolisme plus performant**. Elle permet également, pour certaines espèces, une **production plus importante de toxines**. La lutte contre les biofilms est d'autant plus difficile qu'ils sont **résistants à de nombreux désinfectants.** (Peroxyde d'hydrogène, PH, UV...).

Infection ou maladie	**Espèces bactériennes impliquées**
Carie dentaire	**Bactéries gram positif acidogènes**
Otite	***Haemophilus influenzae***
Infections musculo-squelettique	**Coques gram positif**
Prostatite bactérienne	***E.coli*** **et autres bactéries gram négatif**
Osteomyelitite	**Différentes espèces bactériennes**
Pneumonie cystique fibrosis	***P.aeruginosa*** **et** ***Burkholderia cepacia***
Infections des sutures	***Staphylococcus epidermidis*** **et** ***S.aureus***
Infection des valves cardiaquesmécaniques	***Viridans streptococci, Enterococci***
Infection des lentilles de contact	***P.aeruginosa*** **et autres bactéries gram positif**
Cystite des catheters urinaires	***S.epidermidis, K.pneumoniae, E.faecalis, P.mirabilis***
Greffe vasculaire	**bactéries gram positif**

Tableau 3 : Exemples de maladies dues aux biofilms

Les biofilms sont non seulement sources d'infections, mais leurs résistances accrues aux agressions extérieures entrainent des échecs thérapeutiques.

- Résistance à la phagocytose.

La formation du biofilm est un facteur de résistance face à la réponse immunitaire de l'hôte. Les bactéries sessiles produisent des antigènes enclenchant la production d'anticorps. Les biofilms, entourés de la matrice extracellulaire, ne pouvant être phagocytés, les anticorps produits n'ont pas d'utilité. Ils pourront, en revanche, former des complexes immuns causant des dommages aux tissus environnants. Les infections causées par des biofilms sont rarement soignées uniquement par les défenses immunitaires de l'organisme.

- Résistance aux traitements antibiotiques.

Si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils s'avèrent bien moins probants sur un biofilm. Après un traitement antibiotique, les cellules persistantes, toujours protégées par la matrice, permettront une régénération du biofilm entrainant une récidive de l'infection. (cf. V.3.1)

En outre, les EPS, composant la matrice extracellulaire des biofilms, permettent de protéger les bactéries sessiles contre certains antibiotiques en empêchant leurs diffusions à travers la matrice extracellulaire. Les EPS agissent comme des échangeurs d'ions. L'efficacité de cette protection dépendra essentiellement de la nature des EPS et de l'antibiotique concerné. Plus un antibiotique est hydrophile, comme les aminosides, moins il pourra diffuser et moins il sera efficace. De la même façon, les EPS séquestrent les métaux, les cations et les toxines.

La résistance accrue des biofilms dans l'environnement permet une **propagation meilleure des bactéries** à travers le monde. Les biofilms constituent également un lieu de rencontre étroit dans lequel les bactéries vont pouvoir **échanger du matériel génétique** pouvant conduire à **l'émergence de nouveaux pathogènes** par acquisition de résistance aux antibiotiques, de facteurs de virulence ou de nouvelles capacités de survie à l'environnement.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'émergence de souches multirésistantes *Salmonella* Typhimurium DT104 a suscité de nombreuses interrogations quant aux déterminants génétiques responsables du phénotype de multirésistance observé, ainsi que de leur succès épidémique. Les études menées ont conduit à la description d'un ilot génomique, *Salmonella* Genomic Island I (SGI1), caractérisé par un fort potentiel de recombinaison lié à son intégron complexe In104 et une capacité de mobilisation par transfert horizontal. Les aspects sanitaires et économiques font des salmonelloses un problème de santé publique qui justifie la place importante de cette infection en termes de surveillance et de mise en œuvre de mesures préventives de la contamination. La surveillance des salmonelloses, chez l'homme, est organisée par le centre national de référence des salmonelles (CNR, Institut Pasteur) et le système de déclaration obligatoire des TIAC. Celle-ci est complétée par l'AFSSA qui a en charge la surveillance des salmonelles dans l'environnement, les élevages et la filière agroalimentaire.

Dans ce contexte, les travaux entrepris dans le cadre de la thèse présentaient trois objectifs :

❖ En premier lieu, celui d'approfondir notre connaissance de la variabilité de SGI1 chez les salmonelles du serovar Typhimurium isolées en France chez les bovins, et d'apprécier de ce fait l'importance ou non de l'évolution moléculaire de cet ilôt au cours du temps. Près de vingt années après l'émergence du clone DT104, et compte-tenu des évolutions déjà constatées de SGI1 chez divers autres serovars de *Salmonella*, nous avons souhaité évaluer cette question au sein du serovar originel Typhimurium, qui reste le plus prévalent dans les cas d'infections bovines à salmonelles en France.

❖ En deuxième lieu, d'évaluer si la transmissibilité de SGI1 à d'autres genres bactériens que *Salmonella* recouvrait une réalité de terrain. La flore commensale est constituée de nombreuses espèces bactériennes entre lesquelles les échanges de matériels génétiques sont favorisés par la proximité des bactéries liée à leur habitat commun. Par ailleurs, des travaux récents ont montré la capacité de mobilisation de SGI1 par transfert horizontal *in vitro* chez *E. coli*, laissant supposer qu'un tel transfert puisse (ou ait pu) se produire en conditions environnementales naturelles. Un des objectifs de la thèse a donc été centré sur la recherche d'une telle diffusion, en particulier chez *E. coli* et *Pasteurella*.

❖ Enfin, de contribuer à une meilleure connaissance du rôle que pourrait avoir SGI1 dans une virulence augmentée des souches qui l'hébergent. En effet, quelques études ont tenté d'apporter des éléments de réponse quant à l'implication de SGI1 dans la virulence bactérienne. Les résultats obtenus par ces différentes études ne concordent pas toujours et ne permettent pas d'obtenir une conclusion nette. Ainsi, dans le cadre de la thèse, nous avons mis en oeuvre deux approches permettant d'évaluer le rôle de SGI1 dans la virulence. L'une a consisté à déterminer directement le pouvoir pathogène conféré par SGI1 en modèle rongeur après construction de mutants délétants, et l'autre, à déterminer le rôle de SGI1 dans la formation de biofilms, l'organisation en biofilm favorisant une meilleure colonisation bactérienne, qui peut constituer à son tour un élément d'efficacité du pouvoir virulent final.

RESULTATS

VI. Evolution moléculaire de l'ilôt génomique SGI1 : bilan de la multirésistance aux antibiotiques chez les souches de Salmonella Typhimurium isolées de bovins malades en France de 2002 à 2007.

Le RESAPATH, le Réseau de Surveillance de l'Antibiorésistance des Bactéries Pathogènes, animé par l'AFSSA Lyon, a permis de dresser un bilan de la multirésistance aux antibiotiques chez les souches *Salmonella* Typhimurium isolées de bovins malades en France de 2002 à 2007. Cette étude a été entreprise afin de caractériser les gènes impliqués dans les profils de multirésistance observés chez les souches *Salmonella* Typhimurium isolées de bovins. Elle a permis, d'une part, d'estimer l'implication de SGI1 dans ces profils de multirésistance et, d'autre part, de surveiller l'évolution moléculaire de SGI1. Les résistances aux quinolones et aux céphalosporines de troisième génération ont également été surveillées.

De 2002 à 2007, le RESAPATH a permis la collecte de 380 souches de salmonelles. Le sérotype Typhimurium est prédominant puisqu'il représente 255 isolats suivi du sérotype Dublin (59 isolats), du sérotype Mbandaka (32 isolats), du sérotype Montevideo (19 isolats) et du sérotype Anatum (15 isolats). L'étude de SGI1 a été réalisée sur les souches *Salmonella* Typhimurium présentant une résistance à au moins deux antibiotiques, soit 148 souches parmi les 255 collectées.

VI.1 Profils de multirésistance observés.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont permis de mettre en évidence douze profils différents de multirésistance. (cf. Tableau 4)

Profil de multirésistance	Nombre d'isolats		Résistance à
ACSSuT	115		
ACSSuTNal	14		A Amoxicilline/ampicilline
ACSSuTTmp	8		C Chloramphénicol/florfénicol
ACSSuTGm	2		S Streptomycine/spectinomycine
ACSSuTNalGm	1		Su Sulfamides
ACSSuTTmpGm	1		T Tétracyclines
ACSSuTTmpK	1		Nal Acide nalidixique
ASSu	1		Tmp Triméthoprime
ASSuT	1		Gm Gentamicine
ASSuTmp	1		K Kanamycine
AST	1		
SSuTTmp	2		

Tableau 4 : Profils de multirésistance de souches *Salmonella* Typhimurium isolées de bovins de 2002 à 2007.

Les souches présentant le profil ACSSuT sont largement prédominantes puisqu'elles représentent 115 isolats, soit 77.7% des souches. Deux autres profils représentent une part relativement importante avec 14 isolats pour le phénotype ACSSuTNal, soit 9.4% et 8 isolats pour le phénotype ACSSuTTmp, soit 5.4%.

L'étude des phénotypes de multirésistance permet de noter qu'**aucune souche ne présente de résistance aux céphalosporines de troisième génération.** En revanche, 14 isolats présentent une résistance à l'acide nalidixique qui appartient à la famille des quinolones.

VI.2 Détection de SGI1 et caractérisation des gènes impliqués dans les profils de multirésistance.

VI.2.1 Détection de SGI1.

Pour déterminer l'implication de SGI1 dans les phénotypes de multirésistance observés, la détection de SGI1 a été réalisée sur tous les isolats par méthodes PCR et Southern blot. Chez *Salmonella* Typhimurium, les phénotypes de multirésistance sont, pour la plupart, associés à la présence de SGI1 qui se situe au niveau chromosomique entre le gène *thdf* et le gène *int2* appartenant à un rétronphage. Jusqu'à aujourd'hui le rétronphage présent en aval de SGI1 chez *Salmonella* Typhimurium n'a jamais été observé chez d'autres serovars de *Salmonella.*

Les PCRs n° 1, 2 et 3 utilisant respectivement les amorces U7L12/LJR1, 104RJ/104D, 104RJ/C9L2 ont été réalisées sur les ADNs génomiques de tous les isolats (cf. Figure 42).

Elles permettent l'amplification des jonctions gauche et droite de SGI1 avec le chromosome de *Salmonella* indiquant ainsi la présence de SGI1 (cf. Matériels et Méthodes XIII.4).

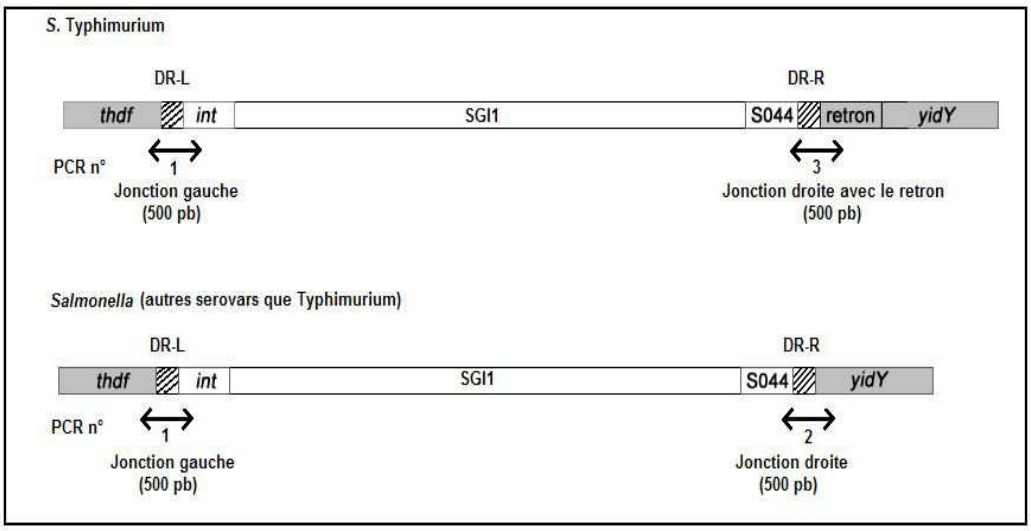


Figure 42 : PCRs permettant l'amplification de SGI1 avec le chromosome.

Parmi les 148 souches étudiées, cinq seulement donnent des résultats PCRs négatifs. En revanche, 143 souches permettent l'obtention de résultats PCRs positifs pour la jonction gauche avec le gène chromosomique *thdf* et pour la jonction droite avec le gène chromosomique *int2*. La PCR correspondant à la jonction droite avec le gène chromosomique *yidY* est négative. Ces résultats confirment d'une part la présence de SGI1 chez ces 143 souches, et d'autre part sa localisation à la position classique entre le gène *thdf* et le rétronphage.

La présence de SGI1 a ensuite été confirmée par Southern Blot en hybridant l'ADN génomique, digéré par l'enzyme de restriction *Xba*I, avec la sonde p1-9 correspondant à une région centrale de SGI1 comprenant les ORFs S023 et S024 (cf. Matériels et Méthodes XIII.5). Pour chacune des 143 souches, le profil Southern Blot est similaire au profil de la souche témoin BN9181 portant SGI1 et présente les deux bandes caractéristiques à 4 et 9 kb. Cette hybridation ADN-ADN recouvre une grande partie de la séquence de SGI1 et permet de confirmer son intégrité.

Ce premier résultat confirme l'implication majeure de SGI1 dans la multirésistance des souches *Salmonella* Typhimurium puisque pour, 96.6% des souches étudiées, il représente le déterminant majeur responsable de la multirésistance.

VI.2.2 Caractérisation des gènes de résistances.

Parmi les 143 souches arborant SGI1, 115 possèdent le phénotype ACSSuT probablement conféré par la structure « classique » de SGI1. En revanche, pour 28 souches, on observe des phénotypes différents avec des résistances additionnelles ou manquantes. Ces phénotypes peuvent être le résultat de la présence d'un variant de SGI1 ou d'une structure SGI1 « classique » combinée à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques situés dans une autre région du chromosome ou portés par un plasmide.

Pour déterminer les gènes impliqués dans les différents phénotypes de multirésistance, une série de PCRs a été réalisée afin de caractériser l'organisation génétique de l'intégron complexe In104 (Cf. Figure 43). Ces PCRs permettent l'amplification des jonctions des différents gènes présents sur la région MDR (PCR n°18 à 22) ainsi que l'amplification des deux cassettes de 1.0 et 1.2 kb appartenant aux deux structures intégrons composant la région de multirésistance (PCR n° 17) (cf. Matériels et Méthodes XIII.4).

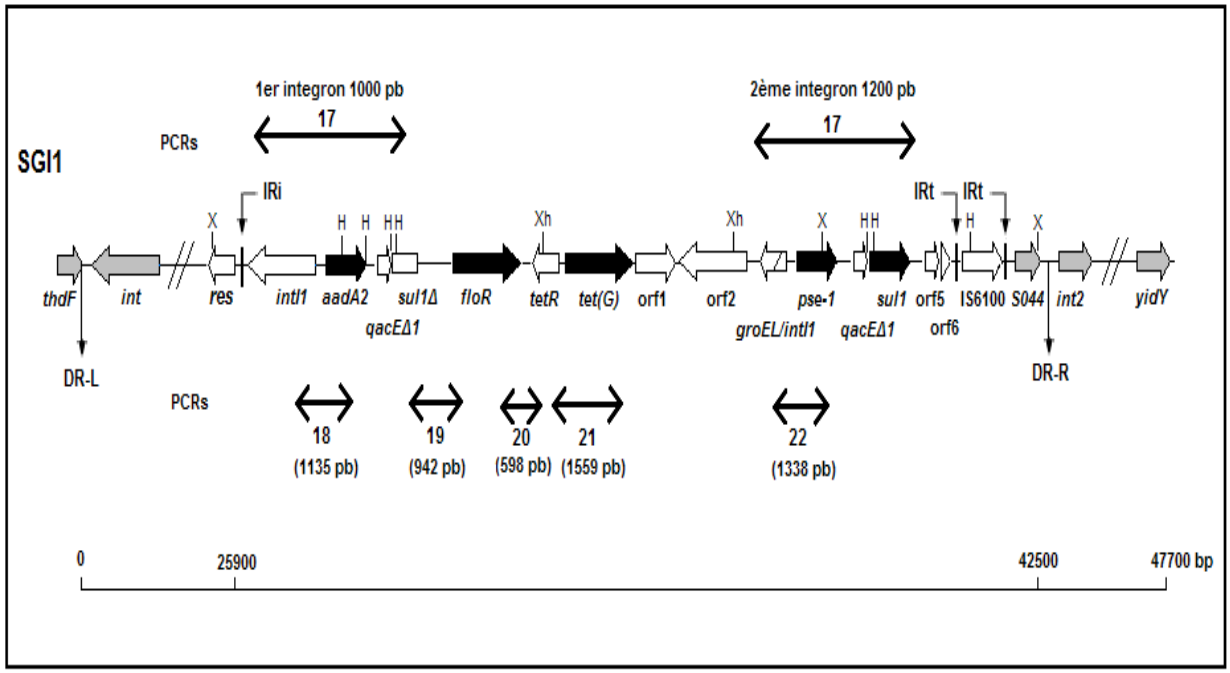


Figure 43 : PCRs réalisées pour la caractérisation de la région de multiréssitance aux antibiotiques. Les ORFs sont indiquées par des flèches. DR-L et DR-R sont respectivement les répétitions gauche et droite encadrant SGI1. IRi et IRt sont les répétitions inverses de 25 pb encadrant l'intégron In104. Sites de restriction : X, *Xba*I; H, *Hind*III; Xh, *Xho*I.

- Pour les 115 souches présentant le phénotype ACSSuT, les PCRs 17 à 22 confirment la présence d'une structure SGI1 classique.

■ 26 souches présentent le phénotype ACSSuT et une ou plusieurs résistances additionnelles à l'acide nalidixique (appartenant à la famille des quinolones), la gentamicine, le triméthoprime ou la kanamycine. Pour ces souches, les PCRs 17 à 22 donnent des résultats positifs indiquant qu'aucune variation génétique de la région MDR n'a eu lieu. Pour confirmer ce résultat, un Southern blot a été réalisé par hybridation de l'ADN génomique, digéré par *Hind*III, avec la sonde pSTF3 qui constitue un fragment de restriction *Xba*I du plasmide recombinant pSTF3 correspondant à la totalité de l'intégron In104. Pour ces 26 souches, le profil Southern Blot est identique à celui de la souche témoin BN9181 portant la structure classique de SGI1 et présente les trois bandes caractéristiques à 2.0, 2.4 et 9.3 kb (cf. Matériels et Méthodes XIII.5). Ce résultat confirme que les gènes responsables des résistances additionnelles observées ne sont pas insérés au niveau de l'intégron complexe In104 mais situés ailleurs dans le chromosome ou sur un plasmide. **Ainsi, les résistances aux quinolones observées ne sont pas associées à la présence de SGI1.**

■ Pour une des souches présentant le phénotype ACSSuTGm, seule la PCR n°17 donne un résultat positif avec l'amplification d'une seule cassette de 1.2 kb qui a été envoyée à séquencer. La séquence nucléotidique obtenue permet de mettre en évidence la présence de la totalité du gène bla_{PSE-1}. Ce résultat indique la possible présence d'un variant SGI1, nommé SGI1-B (décrit précédemment chez *Salmonella* Typhimurium), constitué d'un seul intégron comprenant le gène bla_{PSE-1}.

Pour vérifier cette hypothèse, une PCR a été effectuée en utilisant l'amorce forward de la PCR n°18 qui cible le gène *int1*, et l'amorce reverse de la PCR n°22 qui cible le gène bla_{PSE-1}. Le résultat positif de cette PCR confirme la présence du variant SGI1-B qui est le résultat d'un crossing over entre les séquences conservées 5' des deux intégrons constituant la région de multirésistance. Pour confirmer ce résultat, le Southern Blot utilisant la sonde PSTF3 a été réalisé et donne un profil constitué de deux bandes à environ 2.0 et 3.5 kb qui corrèlent avec l'organisation génétique de SGI1-B.

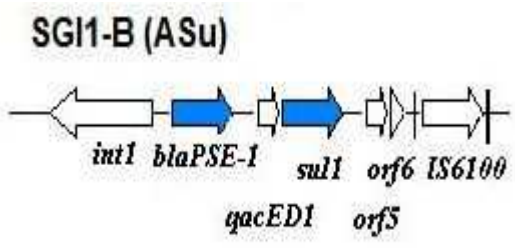


Figure 44 : Structure du variant SGI1-B

La présence du variant SGI-B confère, à la souche qui le porte, un phénotype de résistance à l'ampicilline et aux sulfamides. Chez la souche étudiée, les résistances observées aux

phénicolés et aux tétracyclines sont donc conférées par des gènes, non liés à SGI1, dont la nature et l'environnement ont été déterminés. Une PCR permettant l'amplification du gène *floR* a été réalisée et donne un résultat positif indiquant que les résistances observées au chloramphénicol et au florfénicol sont conférées par ce gène. D'autre part, une série de PCRs a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques des différents gènes *tet,* conférant une résistance aux tétracyclines, les plus souvent rencontrés chez *Salmonella* : *tet(A), tet(B), tet(C), tet(D) et tet(E)*. Un résultat positif a été obtenu pour le gène *tet(C).*

Afin de déterminer la localisation, chromosomique ou plasmidique, des gènes *floR* et *tet(C)*, des expériences de conjugaison ont été menées (cf. Matériels et Méthodes XIII.6). Elles ont permis l'obtention de transconjugants *E.coli* présentant tous une résistance à la fois au chloramphénicol-florfénicol et aux tétracyclines, indiquant la localisation plasmidique des gènes *floR* et *tet(C)*. En outre, l'obtention systématique d'une double résistance suggère que ces deux gènes sont portés par le même plasmide.

■ Pour la souche présentant le phénotype ASSu, les PCRs n°18 à 22 donnent un résultat positif uniquement pour la PCR n°18 spécifique de la cassette contenant le gène *aadA2 et* la PCR n°17 permet uniquement l'amplification de cette même cassette de 1.0 kb. Ce résultat indique la présence d'un variant SGI1, nommé SGI1-C (décrit précédemment chez *Salmonella* Typhimurium, Derby et Agona), qui est le résultat d'un crossing over entre les deux gènes *qacEΔ1sulΔ1* et *qacEΔ1sul1* conduisant à la délétion de toute la région comprise entre ces deux séquences. Pour confirmer la présence du variant SGI1-C, le Southern Blot utilisant la sonde pSTF3 a été réalisé et donne un profil constitué de deux bandes à environ 2.0 et 2.4 kb qui corrèlent avec l'organisation génétique de SGI1-C.

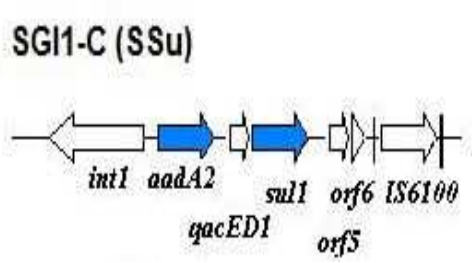


Figure 45 : Structure du variant SGI1-C

Pour cette souche, la résistance à l'ampicilline n'est pas conférée par le variant SGI1-C qui ne comprend pas le gène bla_{PSE-1}. En revanche, une PCR spécifique du gène bla_{TEM-1} qui confère une résistance aux β-lactames donne un résultat positif.

❖ La PCR spécifique du gène bla_{TEM-1} a été réalisée pour tous les isolats. Les résultats indiquent que les souches arborant SGI1 ou SGI1-B, présentent une résistance aux β-

lactames essentiellement conférée par le gène *bla*$_{PSE-1}$. Pour les quatre souches ne portant pas SGI1 ou SGI1 sans *bla*$_{PSE-1}$, la résistance aux β-lactames est toujours conférée par le gène *bla*$_{TEM-1}$ (cf.Tableau 5).

Profil de multirésistance	Nombre d'isolats	Présence de SGI1	Taille (kb) des cassettes	Lysotype (nombre de souche)	Présence du gène *bla*$_{TEM-1}$ (nombre de souches)
ACSSuT	**115**	**SGI1**	**1.0, 1.2**	**104 (106), 104L (8), 104L/ad (1)**	***bla*$_{TEM-1}$ (1)**
ACSSuTNal	**14**	**SGI1**	**1.0, 1.2**	**104 (12), 104L (2)**	***bla*$_{TEM-1}$ (1)**
ACSSuTTmp	**8**	**SGI1**	**1.0, 1.2**	**12/ad (3), 104L (1), 104L/ad (4)**	***bla*$_{TEM-1}$ (2)**
ACSSuTGm	**2**	**SGI1 SGI1-B**	**1.0, 1.2 1.2**	**NT 104L/ad**	**-**
ACSSuTNalGm	**1**	**SGI1**	**1.0, 1.2**	**NT**	**-**
ACSSuTTmpGm	**1**	**SGI1**	**1.0, 1.2**	**104L/ad**	**-**
ACSSuTTmpK	**1**	**SGI1**	**1.0, 1.2**	**104L/ad**	**-**
ASSu	**1**	**SGI1-C**	**1.0**	**104L/ad**	***bla*$_{TEM-1}$**
ASSuT	**1**	**-**	**-**	**104L**	***bla*$_{TEM-1}$**
ASSuTmp	**1**	**-**	**1.4**	**RDNC**	***bla*$_{TEM-1}$**
AST	**1**	**-**	**-**	**104L/ad**	***bla*$_{TEM-1}$**
SSuTTmp	**2**	**-**	**-**	**29/ad, 208**	**-**

Tableau 5 : Bilan de la multirésistance aux antibiotiques shez les souches *S*.Typhirium isolées de 2002 à 2007.

Malgré le fort potentiel de recombinaison de l'intégron In104, **l'évolution moléculaire de SGI1 semble être limitée** puisque le bilan présenté a permis de mettre en évidence uniquement deux variants, SGI1-B et SGI1-C, déjà décrits auparavant, et aucun nouveau variant. **Les souches du panel présentent majoritairement la structure classique de « SGI1 » qui confère la pentarésistance ACSSuT.** Les résistances additionnelles observées, et notamment la résistance à l'acide nalidixique, sont conférées par des gènes non associés à SGI1.

VI.3 Relation entre SGI1, le phage type et le profil PFGE.

Le lysotypage des souches du panel a permis de mettre en évidence la prédominance du phage type 104 ou des phages types associés (DT104L et DT104L/ad) qui représentent 140 isolats. Parmi les huit isolats restant, trois appartiennent aux phages types DT12/ad, un au phage type DT29/ad et un au phage type DT208. Les trois autres sont soit, non typables, soit RDNC (reaction doesn't conform).

Parmi les 140 souches du complexe DT104, **138 (96.5%) possèdent SGI1 confirmant la prévalence de SGI1 chez ce lysotype.**

Les ADNs génomiques des 148 souches ont été digérés avec l'enzyme de restriction *Xba*I. La migration des produits digérés, en électrophorèse en champs pulsés (PFGE), a généré dix profils différents, notés A à J, qui permettent de distinguer la clonalité des souches (cf. Figure 46).

- Parmi les **140 isolats du complexe 104,** 130 présentent le même profil PFGE (profil A) et possèdent tous SGI1. Huit autres sont positifs pour SGI1 et se répartissent entre quatre profils PFGE différents (profil B à E). Les deux dernières souches sont négatives pour SGI1 et présentent deux profils PFGE distincts (profil H et I).
- Les **deux isolats non typables** sont positifs pour SGI1 et présentent le profil A, suggérant leurs appartenances au complexe 104.
- Curieusement, les **trois isolats de lysotype DT12/ad**, positifs pour SGI1, présentent également le profil A. Ce résultat suppose qu'ils appartiennent au même groupe clonal que les souches DT104 appartenant au profil A. La différence observée au niveau de leurs lysotypes est sans doute le résultat de changements de sensibilité par rapport aux phages.
- Les **trois isolats** restant, appartenant aux **lysotypes DT29/ad, DT208 et RDNC133**, sont négatifs pour SGI1 et présentent chacun un profil PFGE différent (profils F, J et G, respectivement).

Le profil A est clairement prédominant puisqu'il représente 135 isolats parmi les 148 étudiés dont 130 appartenant au complexe DT104. **Ce résultat permet de démontrer qu'un seul clone de *Salmonella* Typhimurium DT104 portant SGI1 est responsable de la majorité des salmonelloses bovines.**

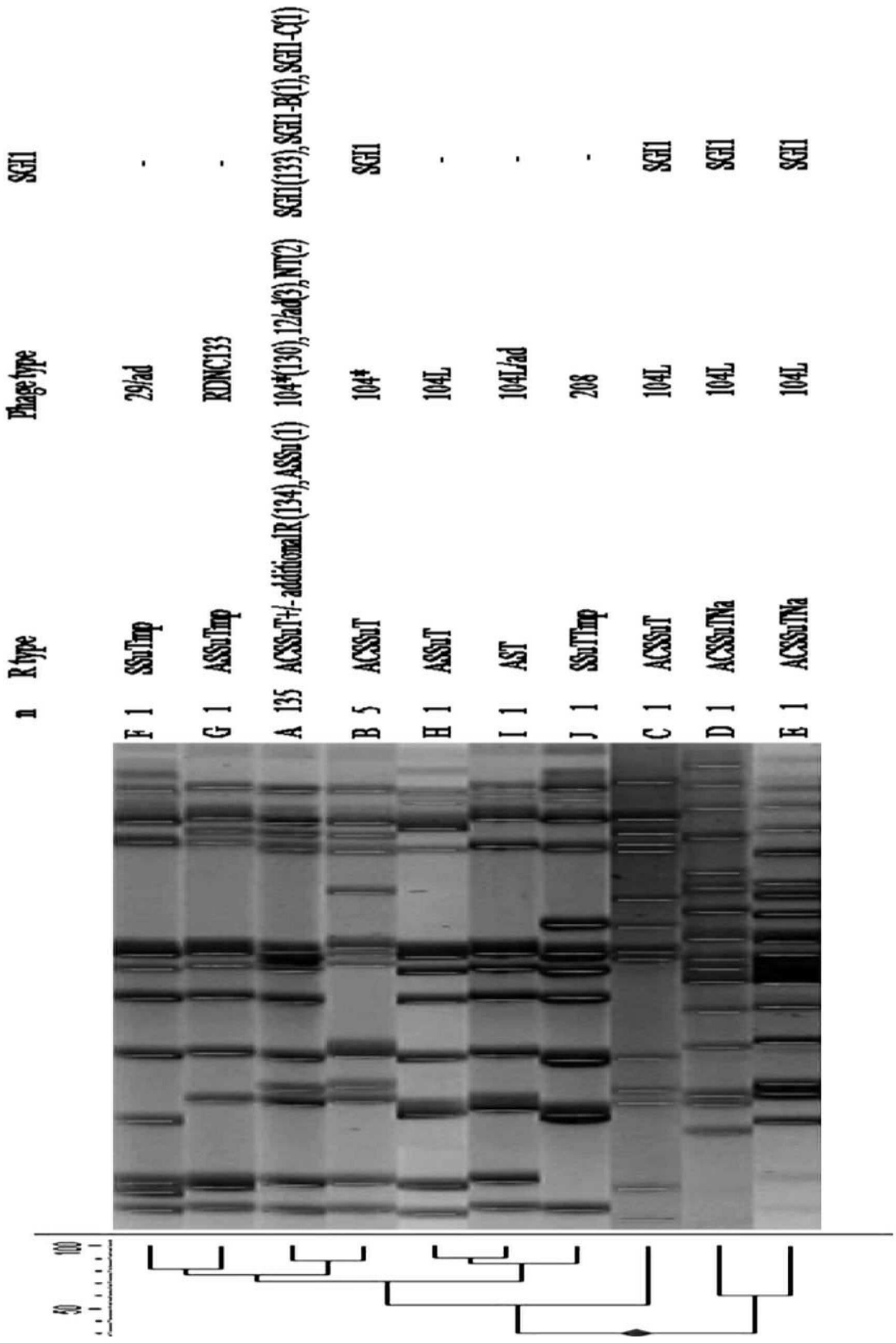


Figure 46 : Différents profils champs pulsés observés pour les souches étudiées notés A à J.

VII. Diffusion inter-espèce de SGI1 : recherche chez d'autres genres que Salmonella..

Parallèlement au bilan décrit dans le chapitre précédent, un criblage de souches contenues dans la collection de l'AFSSA Lyon, a été réalisée pour tenter de détecter l'ilot SGI1 chez différentes espèces bactériennes. La collection de l'AFSSA comprenant plus de 10 000 souches, notamment de l'espèce *E.coli*, un tri préalable a été réalisé pour limiter le nombre de souches à examiner. Nous avons choisi de cibler les souches présentant une résistance au florfénicol qui constitue un bon indicateur de la présence de SGI1 puisqu'elle est codée par le gène *floR*, relativement peu courant chez les pathogènes bovins.
Un premier effort a été porté sur l'espèce *E.coli* car, d'une part, son génome est très proche de celui des salmonelles et, d'autre part, la capacité d'intégration de SGI1 chez des souches *E.coli* a été démontrée in vitro [67].

Entre 1997 et 2007, parmi 3429 souches d'*E.coli* collectées à l'AFSSA Lyon, 599 ont été sélectionnées et criblées.

La détection de SGI1 a été réalisée par PCRs avec des amorces permettant l'amplification des zones jonctions de SGI1 avec le chromosome. Chez *E.coli*, *Salmonella* Genomic Island 1 s'insère au niveau chromosomique entre les gènes *thdf* et *tnaL*. La séquence nucléotidique du gène *thdf* présentant quelques différences par rapport à celui décrit chez *Salmonella,* les amorces utilisées ont été redéfinies pour correspondre aux séquences présentes chez *E.coli* (amorces EcU7L12/LJR1 et 104RJ/Ec104D) (cf. Matériels et Méthodes XIII.4).

Parmi les 599 souches *E.coli* criblées, aucune ne donne de résultat positif pour la présence de SGI1.

En dehors des *E.coli*, une centaine de souches appartenant à d'autres genres bactériens ont été criblées incluant *Pasteurella, Serratia, Pseudomonas, Citrobacter, Klebsiella* ainsi que les salmonelles non incluses dans le bilan décrit dans le chapitre précédent.
Les sites d'intégration de SGI1 à l'intérieur des génomes de ces souches n'ayant pas été caractérisés, nous avons choisi de détecter SGI1 à l'aide de PCRs permettant l'amplification des gènes présents aux extrémités de SGI1 et non pas celles permettant l'amplification des

jonctions de SGI1 avec le chromosome. La détection de SGI1, chez les autres espèces, a donc été réalisée par des PCRs n°8 et 9 utilisant les amorces SGI1-INT-F/ SGI1-INT-R et SGI1-S044-F/ SGI1-S044-R qui correspondent respectivement au gène *int* de SGI1 et à l'ORF S044 (cf. Matériels et Méthodes XIII.4).

La diffusion de SGI1 semble être limitée et confinée aux salmonelles puisque le criblage n'a pas permis de retrouver SGI1 chez d'autres genres que *Salmonella*.

Ce travail nous a cependant permis de repérer deux souches aux profils de multirésistance intéressants que nous avons étudiées plus en détails. La première est une souche *Salmonella* Typhimurium fournie par « The Danish Institute for Food and Veterinary Research (DFVR) » et la deuxième est une souche *Pasteurella trehalosi* collectée dans le cadre de l'activité régulière du réseau RESAPATH (cf. chapitres VIII et IX). L'analyse de ces deux souches sera traitée dans les deux chapitres suivants.

VIII. Caractérisation d'un nouveau variant de Salmonella Genomic Island I, SGI1-T, chez Salmonella Typhimurium.

Dans le cadre de l'étude comparative des séquences de SGI1 présentée précédemment, nous avons eu l'opportunité, à titre de contrôle, d'analyser une souche *Salmonella* Typhimurium acquise à l'AFSSA Lyon, et fournie par le DFVR (cf chapitre VII). Cette souche de *Salmonella* Typhimurium présentait une résistance au florfénicol, au chloramphénicol, à la streptomycine et à la tétracycline.

Ce phénotype de multirésistance suggèrait la possible présence de SGI1 possédant une variation au niveau de la région de multirésistance aux antibiotiques.

VIII.1 Détection de SGI1.

Afin de déterminer si cette souche possède SGI1, les PCRs utilisant les amorces U7L12/LJR1, 104RJ/104D, 104RJ/C9L2 ont été réalisées. Elles permettent l'amplification des jonctions gauche et droite de SGI1 avec le chromosome de *Salmonella* (cf. XIII.4). Les résultats PCRs sont positifs pour la jonction gauche avec le gène chromosomique *thdf* et pour la jonction droite avec le gène chromosomique *int2*. La PCR correspondant à la jonction droite avec le gène chromosomique *yidY* est négative. Ces résultats indiquent la présence de SGI1 chez cette souche et confirment sa localisation entre le gène *thdf* et le rétronphage.

Pour vérifier l'intégrité de SGI1, les PCRs n° 11 à 16 ont été réalisées (cf. XIII.4). Ces PCRs permettent l'amplification de cadres ouverts de lecture situés dans les 10 premières kilobases de la région 5' de SGI1. Les résultats positifs obtenus indiquent l'intégrité de cette région.

La partie restante de SGI1 a été vérifiée par Southern Blot en hybridant, avec la sonde p1-9, l'ADN génomique digéré par l'enzyme de restriction *Xba*I. La sonde p1-9 correspondant à une région centrale de SGI1 comprenant les ORFs S023 et S024 (cf. XIII.5). Le profil obtenu, constitué de deux bandes à environ 4 et 9 kb, est identique à celui de la souche témoin BN9181 possédant une structure SGI1 intègre. Ce Southern blot associé à la série de PCRs permettent de recouvrir la quasi totalité de SGI1 en dehors de l'intégron In104 et les résultats

obtenus permettent de confirmer la présence d'une structure SGI1 intègre chez la souche *Salmonella* Typhimurium étudiée.

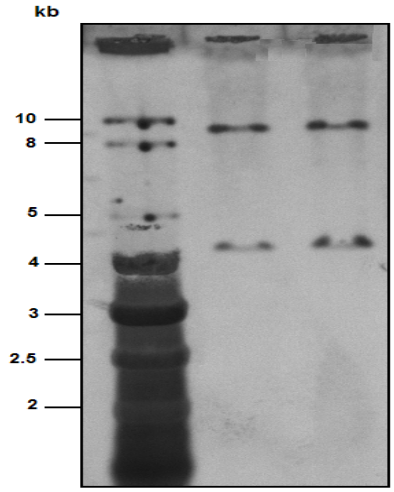


Figure 47 : Southern Blot avec la sonde p1-9 de l'ADN total digéré avec l'enzyme *Xba*I de la souche *S.*Typhimurium n° (lane 2), la souche contrôle *S.*Typhimurium DT104 BN9181 (lane 3). Lane 1: Marqueurs de poids moléculaires.

VIII.2 Caractérisation de l'organisation génétique de l'intégron In104.

La deuxième étape de cette étude a consisté à déterminer l'organisation génétique de l'intégron In104 dont on sait qu'il a subi des variations en raison du phénotype de multirésistance observé qui ne correspond pas au profil classique.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la localisation de la région MDR au sein de SGI1 en effectuant des PCRs qui permettent l'amplification des jonctions de l'intégron In104 avec le reste de SGI1. Les PCRs n°23 et 24 utilisant les amorces S026-FW/int-RV et DB-T1/MDR-B donnent toutes deux des résultats positifs confirmant la localisation de l'intégron In104 entre les ORF S026 et S044 (cf. XIII.4).

Une cartographie de l'intégron In104 a ensuite été réalisée par les PCRs n°17 à 22 en utilisant les couples d'amorces int1/AadA2, Sulter/F3, F4/F6, tetR/tetA, int2/pse1 et 5'CS/3'CS. (cf. XIII.4 et Figure 48). Tous les produits PCRs ont été obtenus exceptés le fragment 22 correspondant à la cassette du gène bla_{PSE-1} et le second intégron de 1.0 kb incluant cette même cassette.

Ces résultats suggèrent donc une variation de l'intégron In104 au niveau de son extrémité droite et notamment au niveau de la structure intégron comprenant le gène bla_{PSE-1}. Afin de préciser la localisation de la région variante, des PCRs additionnelles n°25 à 28 ont été réalisées en utilisant les amorces orf1-F/orf1-R, orf2-F/orf2-R, tetR/orf1-R et orf1-F/orf2-R

(cf. XIII.4). Elles permettent l'amplification des gènes *orf1*, *orf2* et des jonctions entre les gènes *tetR/orf1* et *orf1/orf2*. Les résultats positifs obtenus indiquent que la région variante est localisée en aval du gène *orf2*.

A ce stade de l'étude, il a été supposé que la variation recherchée de l'intégron In104 consistait en une délétion de la deuxième cassette comprenant le gène bla_{PSE-1}. Cette hypothèse corrélait parfaitement avec le phénotype de résistance observée qui ne comprenait pas les résistances à l'ampicilline et aux sulfamides comparativement au phénotype ACSSuT classique. La région comprise entre le gène *groEL/int1* et *IS*6100 a donc été amplifiée par PCR et le produit obtenu d'environ 1.2 kb a été envoyé à séquencer par Beckman Coulter Genomics. La séquence nucléotidique obtenue (déposée à Genbank sous le numéro GU830872) nous a permis de résoudre l'organisation génétique du variant In104 qui présente le gène *groEL/int1* suivi de seulement 403 pb du gène bla_{PSE-1} interrompu par l'élément *IS6100* (cf. Figure 48)

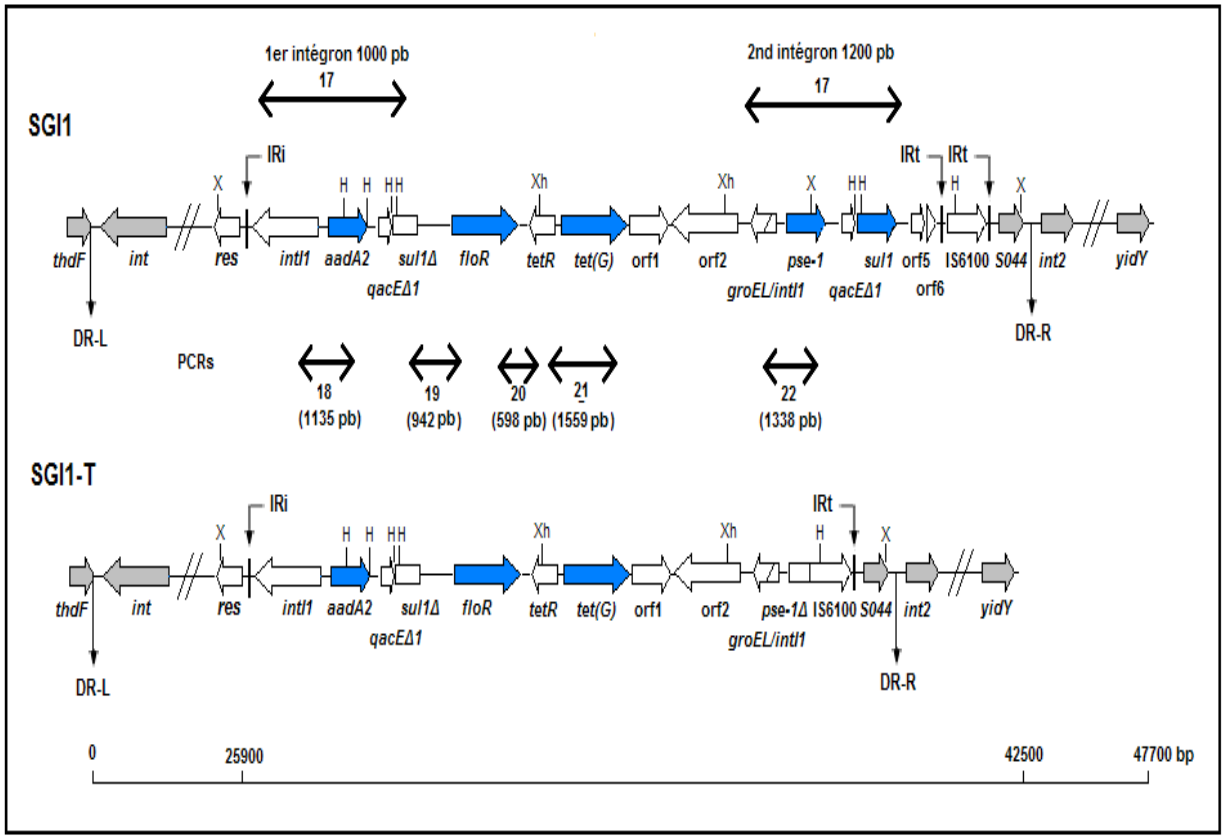
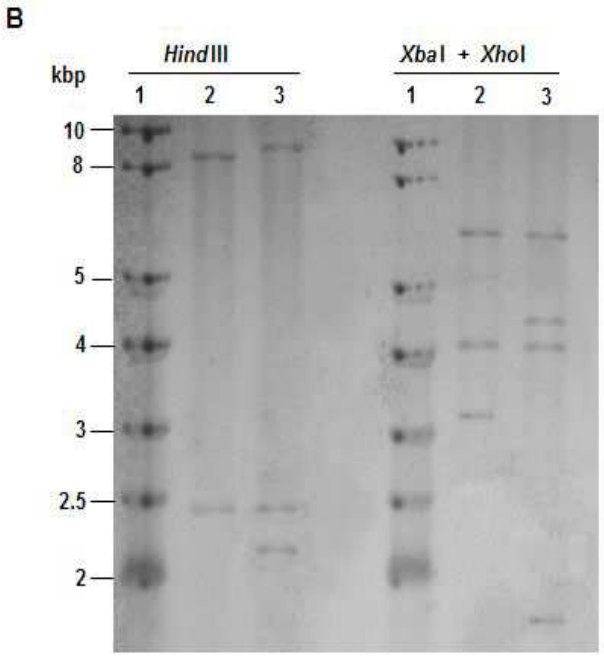


Figure 48 : Organisation génétique de la structure classique SGI1et du nouveau variant SGI1-T. DR-L et DR-R sont respectivement les répétitions gauche et droite encadrant SGI1. IRi et IRt sont les répétitions inverses de 25 pb encadrant l'intégron In104. Sites de restriction : X, *Xba*I; H, *Hind*III; Xh, *Xho*I.

Pour confirmer cette organisation génétique, un Southern blot a été réalisé par hybridation avec la sonde pSTF3 de l'ADN génomique digéré, soit par *Hind*III, (cf. XIII.5), soit par les deux enzymes de restriction *Xba*I et *Xho*I. Les profils obtenus sont clairement distincts de ceux de la souche témoin BN9181 portant la structure SGI1 classique (figure).



Les tailles des bandes obtenues corrèlent parfaitement avec l'organisation génétique caractérisée par PCRs et séquençage puisque nous obtenons deux bandes à environ 8.5 et 2.0 kb lorsque l'ADN est digéré avec *Hind*III et trois bandes à environ 6.0, 4.0 et 3.0 kb lorsque l'ADN est digéré avec *Xba*I et *Xho*I (cf. Figure 49).

Figure 49 : Southern Blot avec la sonde pSTF3 de l'ADN total digéré avec l'enzyme *Hind*III ou *Xba*I+*Xho*I de la souche *S.*Typhimurium n° (lanes 2), la souche contrôle *S.*Typhimurium DT104 BN9181 (lanes 3). Lanes 1: Marqueurs de poids moléculaires

L'organisation génétique décrite dans cette étude constitue un nouveau variant de SGI1 que nous avons proposé de nommer SGI1-T.

L'obtention de ce variant peut être expliquée par une potentielle transposition intramoléculaire de la séquence d'insertion IS*6100* qui conduit à l'insertion d'une copie de cet élément à l'intérieur du gène bla_{PSE-1}. Cette transposition a permis un crossing over ultérieur entre les deux copies IS*6100,* positionnées dans le même sens, qui conduit à la délétion de toute la région comprise entre ces deux éléments incluant une partie du gène bla_{PSE-1}, *qacEΔ1sul1*, *orf5* et *orf6*.

IS*6100* est une séquence d'insertion qui se transpose de manière aléatoire par un mode réplicatif. Aucune répétition directe, comme résultat d'un événement de transposition, n'a été trouvée autour du site d'excision. En revanche, des séquences de 3 pb GCT sont présentes aux extrémités gauches de l'élément IS*6100* et de la séquence délétée.

Chez *S. enterica* Typhimurium DT104, au niveau de SGI1, des réarrangements génétiques produits par l'intermédiaire de l'élément IS*6100* ont déjà été décrits dans de précédentes

études [48] [101]. La transposition réplicative de cette séquence d'insertion, suivie d'une inversion de gène, a conduit à la formation du variant SGI1-E [48]. Il a également été montré que, dans certaines conditions, des souches DT104 pouvaient perdre la séquence du retronphage trouvé classiquement en aval de SGI1. Cette perte du retronphage, qui s'accompagne de la délétion de gènes voisins, est causée par le même mécanisme décrit pour la formation du variant SGI1-T, soit une transposition réplicative de l'élément IS*6100* suivie d'une excision de la séquence comprise entre les deux copies IS*6100.*
Ainsi, IS*6100* est l'un des éléments impliqués dans le fort potentiel recombinatoire de l'intégron In104 et il est fort probable que cet élément joue un rôle dans de futurs réarrangements génétiques.

En incluant SGI1-T, il existe une vingtaine de variants SGI1 décrits, ce qui confirme le fort potentiel de recombinaison de l'intégron In104. Néanmoins, le variant décrit dans cette étude est le résultat d'une recombinaison intramoléculaire qui, en conséquence, ne permet pas l'acquisition de nouveaux éléments génétiques et notamment des gènes de résistances. Ce résultat va donc dans le sens des conclusions tirées du bilan décrit dans le chapitre X qui met en avant une évolution moléculaire limitée de SGI1.

IX. Caractérisation d'un gène de résistance au florfénicol chez Pasteurella trehalosi.

Le criblage de la collection de l'AFSSA Lyon a été réalisé sur des souches présentant une résistance au florfénicol, qui constitue un bon indicateur de la présence de SGI1.

Ce criblage ne nous a pas permis de détecter SGI1 chez d'autres genres bactériens que *Salmonella* mais a permis de repérer une souche *Pasteurella trehalosi* résistante au florfénicol. Ce phénotype de résistance constitue un caractère très intéressant car il n'a été décrit qu'une seule fois chez *Pasteurella*. Il pouvait donc aussi, le cas échéant, évoquer la présence de SGI1 dans cette espèce.

IX.1 Contexte de l'étude.

Les pasteurelles constituent un problème majeur dans l'élevage intensif des ruminants car elles sont responsables de nombreuses pathologies incluant la « septicémie hémorragique » (pasteurellose primaire), les encéphalites, les otites, les méningites, les arthrites et les **pasteurelloses respiratoires** (dites secondaires). Ces dernières sont la principale cause de pertes économiques puisqu'elles entrainent une mortalité qui peut atteindre 10% des animaux, un blocage de la croissance et de l'engraissement des jeunes veaux.
Pasteurella trehalosi est principalement un pathogène des moutons auxquels elle cause des septicémies mais elle a également été isolée chez d'autres ruminants incluant les chèvres, les bisons et les bovins [102-104].

Le florfénicol (cf. III.1.4.3) a été introduit sur le marché en 1995 pour le traitement des infections respiratoires bovines causées par les pasteurelles. Il fait suite au chloramphénicol qui a du être retiré en raison de sa grande toxicité et des phénomènes de résistance grandissant. Depuis quelques années, des résistances au florfénicol, conférées par le gène *floR*, ont été observées chez des souches *Escherichia coli* [41, 42], *Salmonella* [42, 43] et récemment, en 2005, une première et seule résistance chez une souche *Pasteurella* a été observée [44]. Cette souche, isolée au Royaume-Uni, appartient à l'espèce *P.multocida* et présente une résistance au florfénicol conférée par le gène *floR* porté par un plasmide.

Le gène *floR* code une pompe à efflux membranaire, appartenant à la superfamille « major facilitator », qui exporte spécifiquement les phénicolés en dehors de la cellule bactérienne [11]. Il existe plusieurs gènes homologues au gène *floR* nommés *pp-flo, cmlA-like, floSt, flo,* qui possèdent entre 96 et 100% d'identité au niveau de leurs séquences nucléotidiques et dont les protéines possèdent entre 88 et 100% d'identité. Le gène *floR* a été décrit sur la structure SGI1 de *Salmonella* mais également dans plusieurs autres bactéries entériques gram négatif, au niveau plasmidique ou chromosomique [50].

L'utilisation du florfénicol dans la filière bovine induit une pression de sélection qui a sans doute favorisé l'émergence de résistance au florfénicol. La souche *Pasteurella trehalosi* étudiée en est un parfait exemple puisqu'elle a été isolée d'un prélèvement de poumons issu d'un veau atteint d'une pathologie respiratoire.

L'objectif de cette étude a été de caractériser le gène responsable de la résistance au florfénicol chez la souche *Pasteurella trehalosi* n°13698 et de déterminer son environnement génétique.

IX.2 Identification du plasmide pCCK13698.

La souche *Pasteurella trehalosi* 13698 présente une résistance au florfénicol, au chloramphénicol et aux sulfamides.
La première étape de cette étude a consisté à déterminer la nature des gènes responsables du phénotype de multirésistance observé, et notamment celui impliqué dans la résistance eu florfenicol.

Après extraction de l'ADN total et plasmidique de la souche *P. trehalosi*, une série de PCRs a été réalisée en utilisant les amorces F1764-F1765, CmlA-CmlB, cat1/cat2 et sul1/sul2 (cf. XIII.4 PCRs n° 30 à 33) qui permettent respectivement l'amplification des gènes *floR, cmlA, catAIII et sul2*. Le gène *floR* confère une résistance croisée au chloramphénicol et au florfénicol tandis que les gènes *cmlA* et *catAIII* confèrent uniquement une résistance au chloramphénicol. Quant au gène *sul2,* il est responsable d'une résistance aux sulfamides.
Trois produits PCRs ont été obtenus, pour l'ADN total et plasmidique, correspondant aux gènes *floR, catAIII* et *sul2*. Ce résultat nous permet de conclure que **la résistance au**

florfénicol observée chez la souche 13698 est conférée par le gène *floR*. Ce gène est porté par un plasmide nommé pCCK13698.

Après extraction de l'ADN plasmidique de *P. trehalosi* par la méthode de lyse alcaline (cf. Matériels et Méthodes XIII.3.2), des expériences de transformation par choc thermique ou électro-transformation ont été réalisées avec comme souches réceptrices, les souches compétentes *Escherichia coli* JM109, JM110, JM101, HB101 et C600 (cf. Matériels et Méthodes XIII.8). Les transformants ont ensuite été sélectionnés sur géloses LB ou géloses au sang de mouton, supplémentées avec, soit du chloramphénicol (15 mg/l), soit du florfénicol (10 mg/l).
Après de nombreuses tentatives successives, aucun transformant n'a pu être obtenu, suggérant que le plasmide issu de *P. trehalosi* ne se réplique pas dans les souches d'*E.coli*.

La souche compétente *P. multocida* P4000 a alors été choisie comme souche réceptrice et les expériences de transformation ont été menées comme précédemment. Plusieurs transformants ont alors été obtenus et leurs sensibilités aux antibiotiques ont été testées par la méthode de diffusion en milieu gélosé (cf. XIII.2). Chaque transformant présentait une résistance au chloramphénicol, au florfénicol et aux sulfamides, suggérant **la présence sur un même support, sur le plasmide pCCK13698, des trois gènes impliqués dans ces résistances**. Après extraction de l'ADN plasmidique des transformants *P.multocida*, les PCRs correspondant aux gènes *floR*, *catAIII* et *sul2* ont été réalisées et donnent toutes trois des résultats positifs, confirmant ainsi les résultats obtenus sur la souche parentale *P.trehalosi*.

Les CMI des transformants ont ensuite été déterminées par la méthode de dilution en milieu gélosé (cf. XIII.2). Les transformants, ainsi que la souche parentale *P.trehalosi,* présentaient des valeurs de CMI égales à 16, 32 et 512 mg/L pour le florfénicol, le chloramphénicol et les sulfamides, respectivement. La valeur de la CMI pour le chloramphénicol étant relativement basse, la mesure de l'activité de la « chloramphénicol acétyl-transférase » (CAT) a été réalisée par un test colorimétrique CAT (cf. XIII.9). Les taux de désacetylation de l'acetyl-CoA mesurés dans les lysats cellulaires des transformants étaient vingt fois supérieurs au taux observés pour la souche *P.multocida* P4000, dépourvue du plasmide pCCK13698, qui a servi de témoin négatif. Ce résultat confirme l'activité CAT résultant de la présence du plasmide pCCK13698. La faible valeur de CMI pour le chloramphénicol, en présence de deux gènes conférant une résistance au chloramphénicol, reste à expliquer.

Le plasmide pCCK13698 a été complètement séquencé (cf. XIII.10) afin de caractériser complètement son organisation génétique et de pouvoir effectuer une comparaison avec le plasmide pCCK381, identifié précédemment chez *P.multocida*. La séquence obtenue a été déposée dans la base de données du « European Molecular Biology Laboratory » (EMBL) sous le numéro AM183225.

IX.3 Structure et organisation du plasmide pCKK13698.

L'analyse de la séquence obtenue révèle un plasmide de 14969 pb (cf. Figure 50). Les comparaisons de séquences ont été effectuées avec les programmes BLAST, blastn et blastp (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) et le programme ORF finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html).

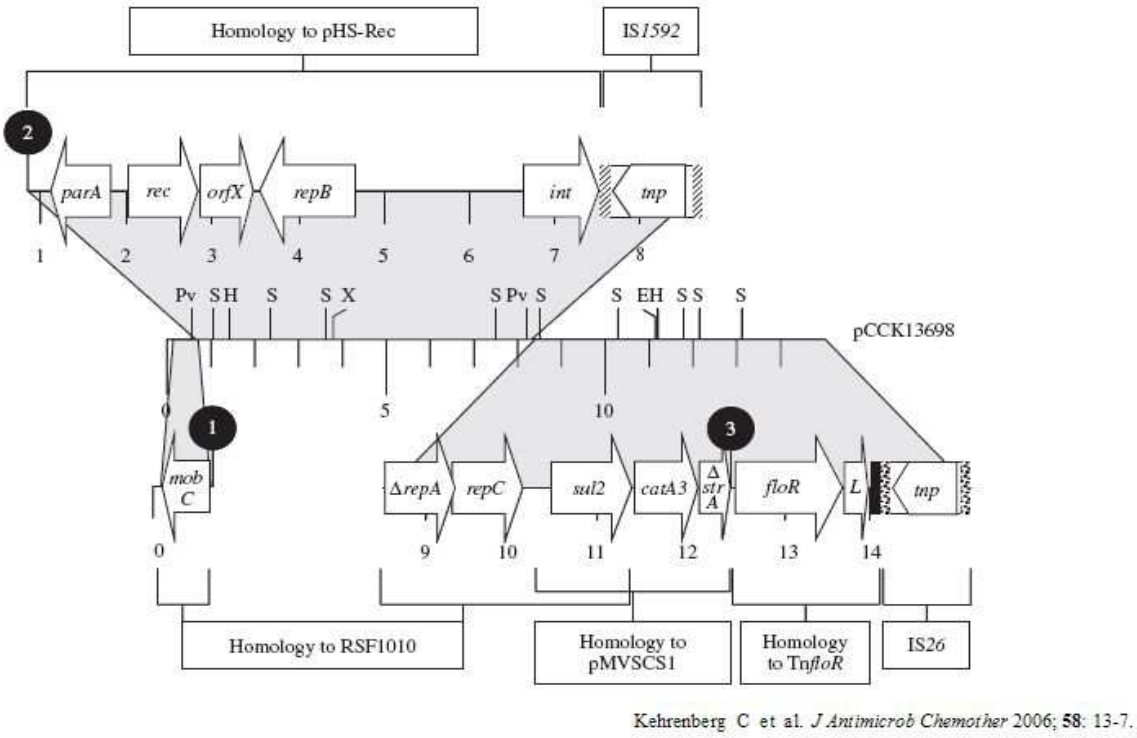


Figure 50 : Organisation schématique du plasmide pCCK13698 (accession n°. AM183225). Les ORFs composant le plasmide sont représentés par des flèches (repA, repB, repC: réplication du plasmide; tnp: transposition; mobC: mobilisation; rec: fonctions de recombinaison; int: fonctions d'intégration; parA: partition de l'ADN; orfX: fonction inconnue; sul2: résistance aux sulfamides ; catA3: résistance au chloramphénicol; floR: résistance au chloramphenicol-florfenicol; strA: résistance à la streptomycine). L'ORF note L correspond au régulateur transcriptionnel lysR-like et le rectangle noir en aval correspondant au 50 pb terminal de la transposase associée au transposon TnfloR. Le symbole Δ indique un gène tronqué. Sites de restriction : E (EcoRI), H (HpaI), Pv (PvuII), S (SspI) et X(XbaI). Sont indiquées également les aires présentant une identité >99% avec les plasmides pHS-Rec, RSF1010 et MVSCS1; avec les séquences d'insertion IS1592/IS1593 et IS26; et avec le transposonTnfloR. Les cercles noirs numérotés 1 à 3 correspondent aux potentiels sites de recombinaison.

Les 635 premières paires de bases du plasmide pCCK13698 présentent de petits segments possédant des similarités avec le **plasmide pCCK381** (positions 1-225) et avec le **plasmide RSF1010**, au niveau d'une région comportant le gène *mobC* (positions 169-635) [105]. La région similaire au plasmide RSF1010 se termine par une séquence de 96 pb qui est identique à un segment interne des ORFs codant les transposases des **séquences d'insertion IS*1592*** et **IS*1593***. La séquence d'insertion IS*1593* provient de *M.haemolytica* (EMBL, n° accession : AJ439064) et la séquence protéique codée par l'IS*1592* diffère uniquement de trois acides aminés par rapport à la séquence codée par IS*1593*.

Une grande partie du plasmide pCCK13698, comprenant 6770 pb (positions 731-7500), correspond à 99.5% au **plasmide pHS-Rec** provenant de *Haemophilus parasuis* [106]. Cette partie inclue les gènes *parA* codant une protéine de partition, *rec* codant une recombinase, *orfX* codant une protéine hypothétique, *repB* codant une protéine impliquée dans la réplication des plasmides et *int* codant une intégrase.

Immédiatement après cette partie, se trouve une copie complète de la **séquence d'insertion IS*1592*** (positions 7497-8527) en aval de laquelle est détecté un segment de 2812 pb possédant des similarités avec le **plasmide RSF1010** (positions 8526-11337). Ce segment inclue un gène tronqué Δ*repA* et les gènes *repC et sul2.*

La séquence comprenant le gène *sul2* fait également partie d'un segment de 1831 pb (positions 10475-12305) qui révèle une identité à 99.7% avec une région de multirésistance décrite sur le **plasmide pMVSCS1** de *Mannheimia varigena* [107]. Ce segment est, en effet, constitué du gène *sul2* qui code une dihydroptéroate synthase résistante aux sulfamides, suivi du gène *catAIII* codant une chloramphénicol acetyl-transférase, et du gène Δ*strA,* largement tronqué, qui code initialement une streptomycine phosphotransférase.

Le gène Δ*strA* est suivi d'un segment de 1801 pb (positions12306-14149) qui présente 99.7% de similarité avec la séquence du **transposon Tn*floR*** [67]. Ce segment comprend le gène *floR*, une phase ouverte de lecture codant pour un régulateur transcriptionnel LysR-like et les 51 premières paires de bases du gène codant pour la transposase associée au transposon Tn*floR*.

Immédiatement après ce segment, se trouve une copie complète de la **séquence d'insertion IS*26*** (positions 14150-14969), d'une taille de 820 pb et encadrée par des répétitions directes de 14 pb. Cette séquence d'insertion n'a jamais été décrite chez les pasteurelles mais a déjà été retrouvée chez de nombreuses entérobactéries incluant *E.coli* (AF550679), *Salmonella enterica* (AY333434), *Klebsiella pneumoniae* (AY123253), *Serratia marcescens* (BX664015), *citrobacter ferundii* (AF550415) etc.

IX.4 Sites d'intégration et de recombinaison du plasmide pCCK13698.

Le segment homologue au plasmide pHS-Rec est encadré par une copie complète de la séquence d'insertion IS*1592* et une copie tronquée de ce même élément. Cette observation suggère que ce segment aurait pour origine une transposition intermoléculaire ayant impliqué un plasmide similaire à pHS-Rec dont une partie est encadrée par deux copies complètes de la séquence d'insertion IS*1592*.

Les deux séquences d'insertion IS*1592*, englobant la partie homologue au plasmide pHS-Rec, sont elles-mêmes entourées de deux parties homologues au plasmide RSF1010. Une comparaison des séquences des plasmides pCCK13698, RSF1010, pHS-Rec et la séquence d'insertion IS*1593* ont permis de mettre en évidence, sur le plasmide pCCK13698, deux sites potentiels de recombinaison (cf. Figure 50 et 51).

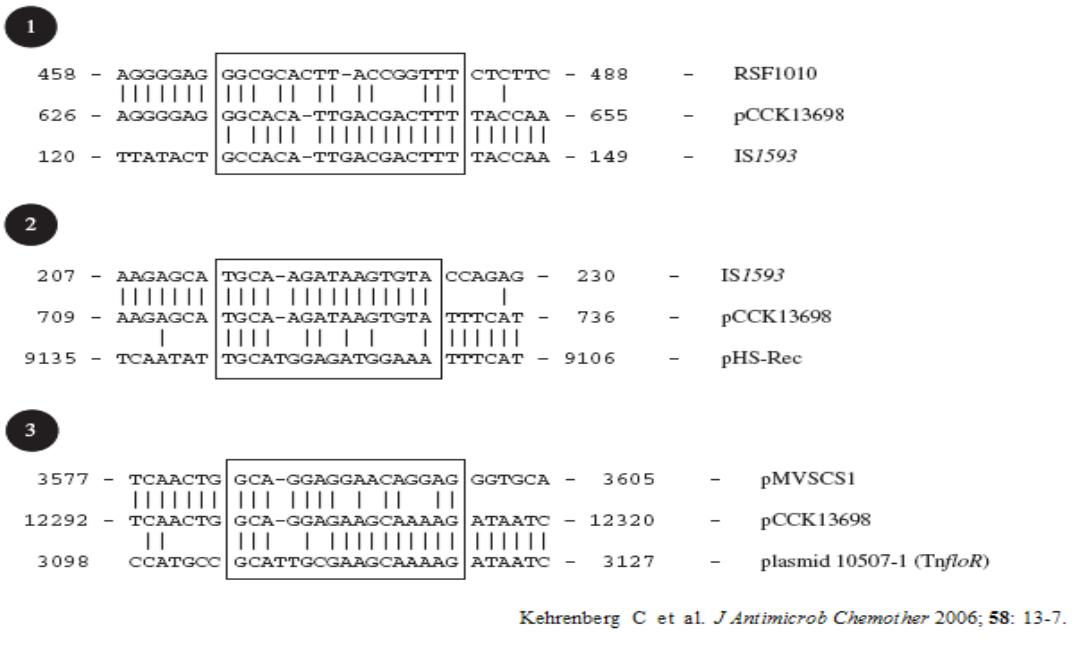


Figure 51 : Mise en évidence des trois sites de recombinaison potentiels présents sur la plasmide pCCK13698.

Le premier site est localisé à la jonction entre la partie homologue au plasmide RSF1010 et la copie tronquée de la séquence d'insertion IS*1592*. Il est constitué de 17 pb et présente 16 pb similaires avec la séquence de l'élément IS1593, et 12 pb similaires à la séquence du plasmide RSF1010.
Le deuxième site est localisé à la jonction entre la copie tronquée de l'élément IS*1592* et la séquence homologue au plasmide pHS-Rec. Il est constitué de 15 pb et présente une identité parfaite avec 15 pb de la séquence de l'élément IS1593, et 9 pb similaires à la séquence du plasmide pHS-Rec. Une recombinaison moléculaire entre le plasmide pHS-Rec et une copie de l'élément IS*1592* au niveau de ce site de recombinaison expliquerait la délétion d'une large partie de la séquence IS*1592*.

Certains éléments transposables génèrent des répétitions directes au niveau de la séquence cible après transposition. Pour la séquence d'insertion IS*1592,* il n'y a pas de répétitions directes déterminées. Au niveau de la séquence pCCK13698, aucune répétition directe n'encadre la séquence d'insertion.

Sur le plasmide pCCK13698, les parties homologues aux plasmides RSF1010 et pMVSCS1 présentent toutes une séquence nucléotidique commune comprenant le gène *sul2*. Cette région commune constitue un site potentiel de recombinaison.

La partie homologue au plasmide pMVSCS1 se termine par un gène tronqué Δ*strA* qui est suivi du gène *floR* appartenant au transposon Tn*floR*. Une comparaison des séquences des plasmides pMVSCS1, pCCK13698 et du transposon Tn*floR* a permis de mettre en évidence **un site de recombinaison entre Δ*strA* et *floR*.** Il est constitué de 16 pb qui présentent 12 pb similaires à la séquence du gène *strA* porté par le plasmide pMVSCS1 et 14 pb similaires au transposon Tn*floR*. Une recombinaison au niveau de ce site expliquerait la délétion d'une large partie du gène *strA* et d'une partie du transposon Tn*floR*.

Le transposon Tn*floR* est interrompu, au niveau de son extrémité droite, par la séquence d'insertion IS*26*. Il a été déterminé que l'élément IS*26* génère, lors de sa transposition, des répétitions directes de 8 pb. Or sur la séquence de pCCK13698, aucune répétition directe n'encadre la séquence d'insertion. Ceci peut être expliqué par le fait que de nombreuses recombinaisons ultérieures ont eu lieu, avec, pour conséquences, la modification ou la délétion des séquences amont et aval de la séquence d'insertion IS*26*. L'origine de l'élément

IS*26* retrouvé sur le plasmide PCCK13698 n'est pas connu mais il est intéressant de noter que deux copies de cette séquence d'insertion, encadrant un segment comprenant les gènes Δ*repA*, *repC, sul2, strA et strB*, ont été retrouvées sur un plasmide décrit chez *Salmonella* Enteritidis [108].

Pour résumer, **l'organisation génétique du plasmide pCCK13698 révèle une structure exclusivement constituée de segments appartenant à des éléments mobiles précédemment décrits dans d'autres études [105-108].** Ces structures mobiles incluent les plasmides, les transposons et les séquences d'insertion. **La formation du plasmide pCCK13698 est sans soute le résultat de recombinaisons interplasmidiques associées à des événements de transpositions intra ou intermoléculaires.**

La plupart des structures mobiles impliquées dans la formation du plasmide pCCK13698 ont déjà été décrites dans la famille *Pasteurellaceae*. En revanche, cette étude a permis la première description, chez une souche *Pasteurella*, de la séquence d'insertion IS*26* qui est largement retrouvée chez les entérobactéries. Cette observation appuie l'hypothèse d'un transfert horizontal entre les familles *Pasteurellaceae* et *Enterobacteriaceae.*

IX.5 Utilisation du florfenicol et pression de sélection.

L'étude réalisée a permis la première description de gènes de résistance chez *P.trehalosi*. Ces gènes de résistances incluent notamment le gène *floR* qui, en dehors de cette étude, n'a été décrit qu'une seule fois chez une souche appartenant à la famille *Pasteurellaceae*. Le gène *floR,* décrit chez la souche 13698, est porté par le plasmide pCCK13698 qui est sans doute le résultat de nombreux événements de recombinaisons. Cette étude confirme la plasticité génomique des bactéries qui permet, sous contraintes environnementales, l'émergence de nouvelles structures mobiles support de gènes leur conférant des avantages considérables de survie.

La souche étudiée représente certainement un prélude à la dissémination des gènes de résistances au florfénicol parmi les *Pasteurellaceae* car son utilisation en filière bovine induit une pression de sélection qui favorise l'émergence de souches résistantes.

Une utilisation raisonnée du florfenicol apparait donc nécessaire afin de limiter les phénomènes de résistances chez *Pasteurella* qui engendreraient de nombreux échecs thérapeutiques. Rappelons, en effet, que le florfenicol constitue l'antibiotique de choix pour traiter les infections respiratoires bovines liées aux pasteurelles.

X. Construction des souches utilisées pour déterminer le rôle de SGI1 dans la virulence et la formation de biofilm.

L'étude du rôle de SGI1 dans la virulence bactérienne et la formation de biofilm a nécessité une première étape consistant en la construction de souches isogèniques ne se distinguant que par la présence ou l'absence de SGI1. Initialement, un panel de souches a été choisi constitué de différents serovars de souches *Salmonella* d'origines diverses, ainsi que d'une souche *E.coli.* L'addition ou la délétion de SGI1 ont ensuite été réalisées afin d'obtenir des couples ou trio isogéniques récapitulés dans le Tableau 6.

Nom de la souche	Origine	Modification effectuée	Présence de SGI1 (Nombre de copies)
***S.*Typhimurium DT104 1948Sa96**	**Bovine**	**/**	**+ (1)**
***S.*Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1**	**Bovine**	**Délétion de SGI1**	**-**
***S.*Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1**	**Bovine**	**Addition de SGI1**	**+ (>1)**
***S.*Typhimurium DT104 1948Sa96C2SGI1**	**Bovine**	**Addition de SGI1**	**+ (1)**
***S.*Typhimurium DT104 024217**	**Humaine**	**/**	**-**
***S.*Typhimurium DT104 024217 + SGI1**	**Humaine**	**Addition de SGI1**	**+ (1)**
***S.*Typhimurium DT104 023377**	**Humaine**	**/**	**-**
***S.*Typhimurium DT104 023377 +SGI1**	**Humaine**	**Addition de SGI1**	**+ (1)**
***S.*Typhimurium LT2**	**Humaine**	**/**	**-**
***S.*Typhimurium LT2 + SGI1**	**Humaine**	**Addition de SGI1**	**+ SGI1-F (>1)**
***S.*Enteritidis PT8**	**Humaine**	**/**	**-**
***S.*Enteritidis PT8 + SGI1**	**Humaine**	**Addition de SGI1**	**+ (>1)**
***S.*Schwarzengrund**		**/**	**-**
***S.*Schwarzengrund + SGI1**		**Addition de SGI1**	**+ SGI1-F (1)**
E.coli	**-**	**/**	**-**
***E.coli* + SGI1**	**-**	**Addition de SGI1**	**+ (>1)**

Tableau 6 : Récapitulatif des constructions réalisées.

Mis à part les constructions des souches *S*.Typhimurium LT2 + SGI1, *S*.Enteritidis PT8 + SGI1 et *S*. Schwarzengrund + SGI1 (déjà publiées et fournies par l'INRA Nouzilly), l'ensemble des autres mutants délétants a été réalisé dans le cadre du travail de thèse

X.1 Modification du plasmide Red Helper pKD46.

Nous avons tout d'abord choisi de déléter SGI1 d'une souche possédant un fond génétique permettant d'assurer le phénotype de virulence. La souche ***S*.Typhimurium DT104 1948Sa96** d'origine bovine et virulente nous a ainsi été fournie par l'INRA Nouzilly. La délétion de SGI1 du génome de cette souche a été réalisée par la méthode « one-step inactivation of chromosomal gene" mise au point par Datsenko et Wanner (cf. Matériels et Méthodes XIV). Cette méthode requiert une étape de transformation de la souche à déléter avec le plasmide Red Helper pKD46 qui porte un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des colonies transformées. Cependant, en raison de la présence de SGI1, la souche 1948Sa96 présente un phénotype de multirésistance qui inclue la résistance à l'ampicilline, rendant impossible la sélection ultérieure des colonies transformées avec le plasmide Red Helper pKD46. Une modification de ce plasmide a donc été requise afin de changer le phénotype de résistance qu'il confère.

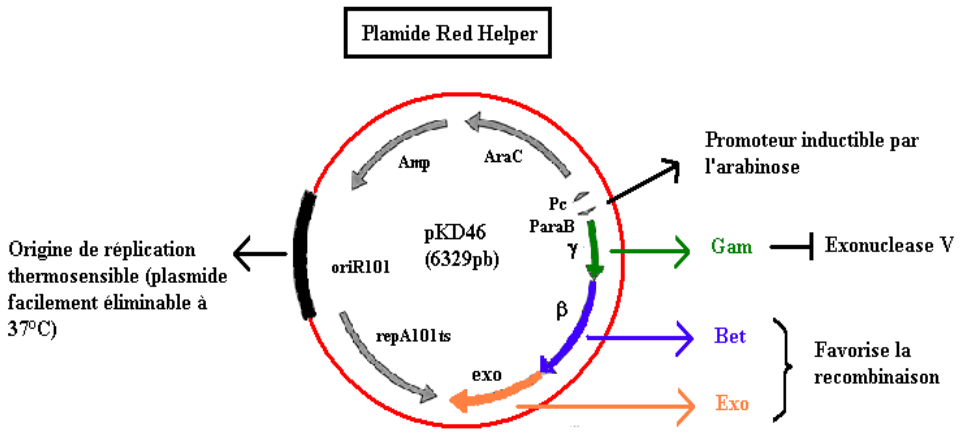


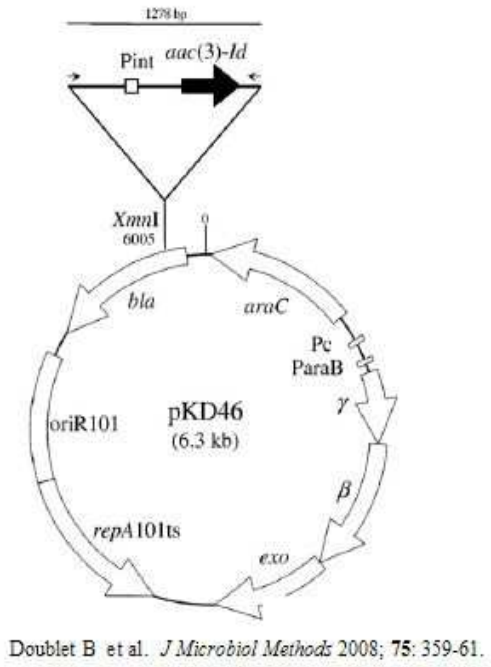
Figure 52 : Représentation schématique du plasmide Red Helper pKD46. Les ORFs sont indiquées par des flèches. *Amp* désigne le gène de résistance à l'ampicilline. Le système λ Red inclue trois gènes: γ, β, and exo.

Le gène de résistance à la gentamicine, *aac(3)-Id*, également nommé *aacC5*, a été introduit à l'intérieur du gène *bla* (ou *Amp*) du plasmide pKD46 afin de ne pas muter les séquences annexes et d'obtenir un plasmide résistant à la gentamicine.

Expérimentalement, le plasmide pKD46, extrait par la méthode de lyse alcaline, a tout d'abord été linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction *Xmn*I (20 U) qui coupe à bouts francs et qui possède un seul site de restriction situé dans le gène *bla* conférant la résistance à l'ampicilline. Le mélange de ligation a été incubé à 37°C pendant quatre heures puis l'enzyme *Xmn*I a été inactivée par incubation à 65°C pendant 15 minutes. Le vecteur pKD46 linéarisé a ensuite été purifié avec le kit QIAquick PCR purification.

D'autre part, le gène de résistance à la gentamicine, *aac(3)-Id* ainsi que la région promotrice de l'intégron in104 de SGI1 ont été amplifiés par PCR à partir des plasmides nommés pBD12A ou pBD11A, construit par Doublet et al, en utilisant les amorces intI et aacR [51]. Le produit PCR généré, d'une taille de 1278 bp, a été purifié sur gel avec le kit QIAquick Gel Extraction kit.

La réaction de ligation a été réalisée avec la T4 DNA ligase (20 U) et un rapport insert/vecteur de 3/1, soit 90.9 ng de produit PCR et 30.3 ng de vecteur pKD46 linéarisé. Le mélange de ligation a été purifié avec le kit QIA quick PCR purification.



S'ensuit la transformation, par électroporation, du vecteur modifié dans 40 µl de bactéries compétentes *E.coli* Top10. Les souches transformées sont sélectionnées sur boites de géloses LB contenant 10µg/ml de gentamicine. Le plasmide, résultant de la ligation de l'insert au niveau du site de restriction *Xmn*I du plasmide pKD46, a été nommé pKD46-Gm (cf. Figure 53) et, de manière analogue, les souches transformées avec ce plasmide ont été nommées *E.coli* Top10 pKD46-Gm.

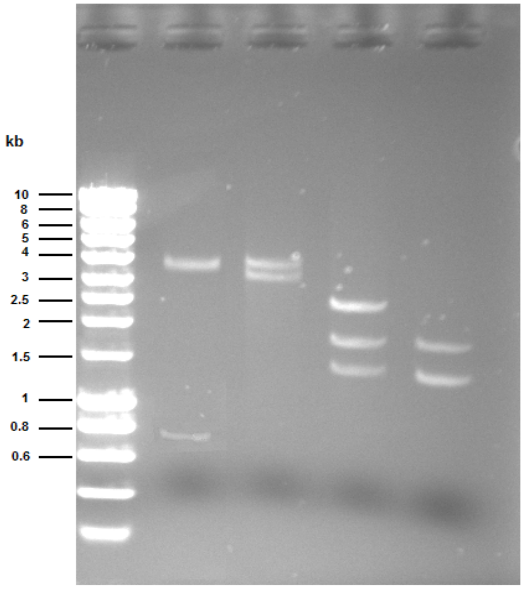
Figure 53 : Représentation schématique du plasmide pKD46 exprimant la recombinase λ Red et le fragment PCR de 1278 pb contenant le gène de résistance à la gentamicine, aac(3)-Id. Les promoteurs Pint, Pc, ParaB et λpR sont représentés par des cadres blancs. Le site de restriction *Xmn*I au niveau du gene de résistance à l'ampicilline, *bla*, est indiqué. Les flèches représentent les amorces int1 et aacR utilisés pour amplifier le gène de résistance aac(3)-Id et le promoteur Pint.

Après extraction par kit Qiagen, l'ADN plasmidique des souches *E.coli* Top10 pKD46-Gm est soumis à une série de tests afin de vérifier l'introduction de l'insert au sein du gène *bla*.

Une comparaison des profils de restriction avec l'enzyme *Bgl*I des plasmides pKD46-Gm, pKD46, pBD11A et pBD12A a été réalisée. Pour rappel, les plasmides pBD11A et pBD12A, possédant le gène *aac(3)-Id*, ont servi de matrice pour l'amplification de l'insert. Ils ont été additionnés au test de vérification afin de s'assurer que les souches transformées, sélectionnées sur gentamicine, n'ont pas récupéré ces plasmides qui auraient pu se retrouver dans le mélange de ligation malgré l'étape de purification sur gel.

Les plasmides sont soumis à une digestion avec l'enzyme *Bgl*I (20U) et les fragments de restrictions sont séparés par électrophorèse.
Le tableau récapitule les bandes théoriquement obtenues.

	pKD46	pKD46-Gm (avec insert positionné dans sens 1)	pKD46-Gm (avec insert positionné dans sens 2)
Taille (pb) des fragments de restriction.	2947	3524	2687
	3382	3382	3382
		701	1538



Les profils de digestion obtenus, représentés dans la figure ci-contre, permettent de noter que l'ADN plasmidique extrait des souches transformées *E.coli* Top10 pKD46-Gm, n'est pas contaminé par l'ADN des plasmides pBD11A et pBD12A.

Figure 54 : Profils de restriction des ADNs plasmidiques digérés par l'enzyme BglI, des souches *E.coli* Top10 pKD46-Gm (lanes 2), *E.coli* pKD46 (lane 3), *E.coli* pBD11A (lane 4) et *E.coli* pBD12A (lane 5). Lane 1 : Marqueurs de poids moléculaires.

Sur la figure 54, le profil de restriction du plasmide pKD46-Gm, clairement distinct de celui du plasmide témoin pKD46, présentent deux bandes dont une de haut poids moléculaire qui correspond aux fragments de restriction de 3524 et 3382 pb, et une, de poids moléculaire inférieure, qui correspond au fragment de restriction de 701 pb. Ce profil indique que l'insert a bien été ligué dans le vecteur pKD46 et dans le sens 1.
Le profil de restriction du plasmide pKD46 présente les deux bandes de tailles attendues à 2947 et 3382 pb.

Une série de trois PCRs a également été réalisée pour vérifier la structure du plasmide pKD46-Gm (cf. XIII.4)
La PCR n° 35 utilise des amorces qui correspondent à des régions encadrant l'insert et qui se situent sur les séquences résiduelles du gène *bla*.
Les PCRs n°36 et 37 permettent l'amplification des jonctions gauche et droite de l'insert avec les séquences résiduelles du gène *bla*.
Toutes trois donnent des résultats positifs confirmant la construction obtenue.

X.2 Délétion de SGI1 de la souche S.Typhimurium 1948Sa96.

X.2.1 Transformation de la souche Salmonella 1948Sa96 avec le plasmide Red Helper pKD46-Gm.

Le plasmide pKD46-Gm construit a ensuite été utilisé pour déléter l'ilot génomique SGI1 de la souche *S.*Typhimurium 1948Sa96.
40 µl de cellules de la souche *Salmonella* 1948Sa96 rendues compétentes sont mises en contact avec 120 ng du plasmide Red Helper pKD46-Gm dans une cuve refroidie.
Après électroporation, les cellules transformées sont reprises dans 1 ml de bouillon SOC et mises à incuber à 30°C pendant deux heures pour permettre la réplication du plasmide Red Helper pKD46-Gm, puis la nuit à température ambiante.

Après incubation, la culture bactérienne est centrifugée à 5000 rpm pendant 15 min puis le culot est resuspendu avec 200µl de bouillon SOC et réparti sur des boites LB complémentées avec de la gentamicine à 20µg/ml. Les boites de sélections sont incubées à 30°C et les souches transformées obtenues ont été nommées *S.* Typhimurium 1948Sa96 pKD46-Gm.

X.2.2 Préparation du produit PCR à électroporer.

A partir d'un plasmide matrice nommé pKD4 (cf. Matériels et Méthodes XIV), est généré par PCR un fragment d'ADN linéaire, contenant la cassette de résistance à la kanamycine, bordée par 2 sites FRT et 2 extensions de 34 à 50 nt homologues aux gènes encadrant SGI1. Pour ce faire, ont été définies des amorces hybrides (RecSGI1-F et RecSGI1-R) constituées de 20 nucléotides spécifiques de la cassette Kanamycine du plasmide pKD4 (P1 et P2) et 50 nucléotides correspondant aux deux extrémités de l'ilot SGI1 (H1 et H2).

P1 (spécifique de la cassette Kanamycine) : GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
H1 (pb 114 à 163 de *thdF*) :
CCGACGACCTGCTGGGACGGATTTTCTCCAGCTTCTGTATTGGGAAGTAA

P2 (spécifique de la cassette Kanamycine) : CATATGAATATCCTCCTTAG
H2 (pb 42597 à 42646 entre SGI1 et le retron)
H2 : GGCAGTTAATGCGGGTTAGTGAACGTTCACTGACGAGGGTGGACTAAAAC

RecSGI1-F = P1H1 et RecSGI1-R = P2H2 (cf. XIII.4)

Le produit PCR est ensuite purifié sur gel d'agarose par le kit Macherey Nagel et digéré par l'enzyme de restriction *dpn*I afin d'éliminer l'ADN plasmidique initial méthylé non amplifié. Il est ensuite purifié une nouvelle fois et concentré.

X.2.3 Electroporation des souches S.Typhimurium 1948Sa96 pKD46-Gm avec le produit PCR.

40 µl de cellules de la souche *Salmonella* Typhimurium 1948Sa96 pKD46-Gm rendues compétentes sont mises en contact avec 1.5 µg du produit PCR concentré dans une cuve refroidie.
Après électroporation, les cellules transformées sont reprises dans 1 ml de bouillon SOC et mises à incuber à 37°C pendant deux heures afin d'éliminer le plasmide pKD46, puis la nuit à température ambiante.

Les transformants résistants à la gentamicine et à la kanamycine sont sélectionnés sur des boites LB complémentées avec de la gentamicine à 20µg/ml et de la kanamycine à 50µg/ml. Après incubation à 37°C, une seule colonie a été obtenue sur les boites de sélection. Afin d'éliminer complètement le plasmide Red Helper pKD46-Gm, la colonie est repiquée en bouillon BHI et mise à incuber à 43°C. Après incubation, on vérifie sa sensibilité à la gentamicine sur boites de sélections.

Le transformant, obtenu, nommé *Salmonella* Typhimurium 1948Sa96ΔSGI1, a donc été délété de toute la région SGI1, soit 43 kb, qui a été remplacée par un gène unique de résistance à la kanamycine (cf. Figure 54).

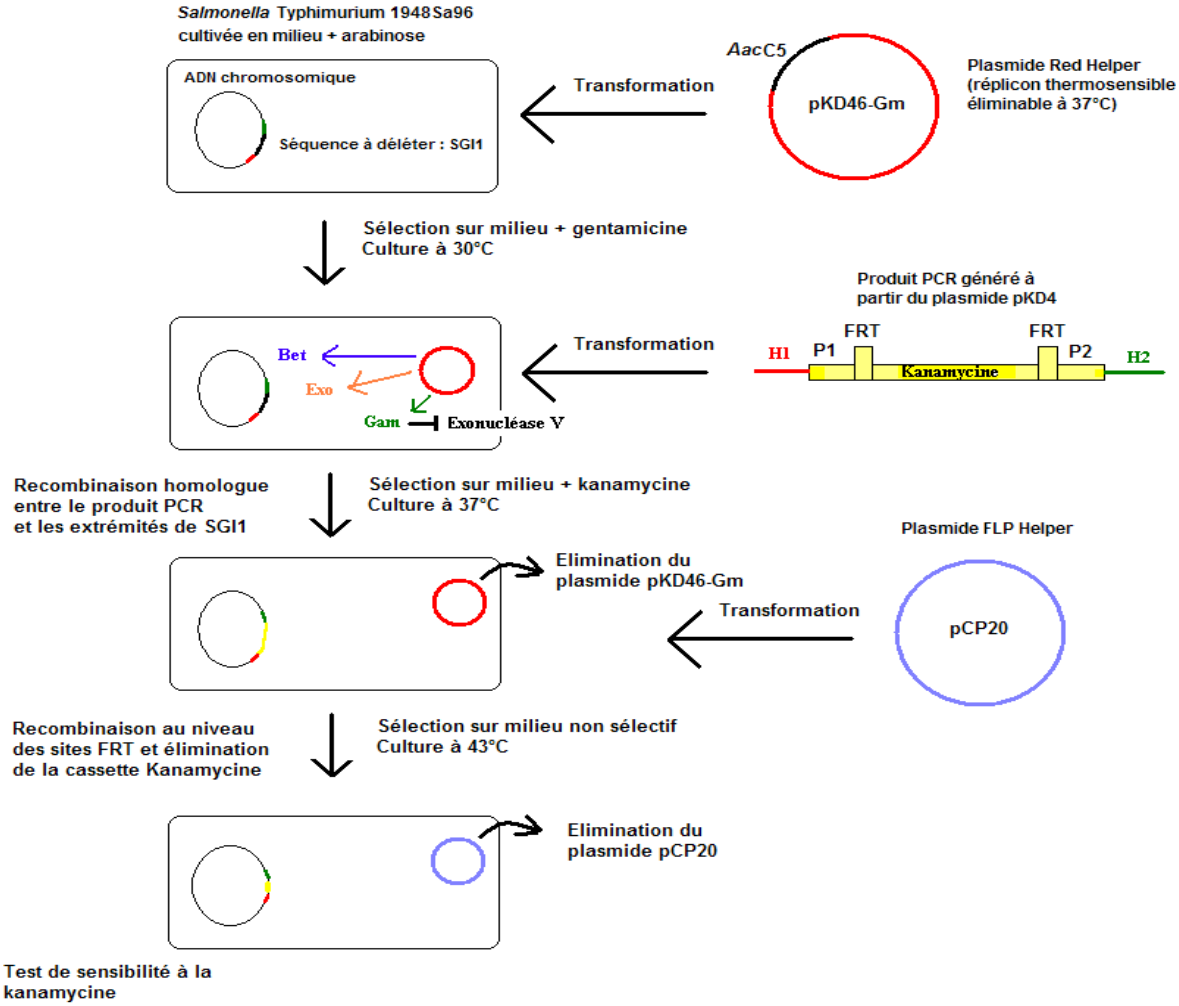


Figure 55 : Délétion de l'ilot génomique SGI1 du génome de la souche *S.*Typhimurium 1948Sa96 avec la méthode « one-step inactivation of chromosomal gene »

X.2.4 Vérification de la construction par PCR.

Pour vérifier que la construction obtenue est celle attendue, nous procédons à une série de six PCRs avec des amorces qui permettent l'amplification, soit de régions correspondant à la séquence insérée, soit aux jonctions de la cassette kanamycine avec les gènes chromosomiques qui encadraient initialement SGI1 (cf. XIII.4, PCRs n°38 à 43)

X.3 Addition de SGI1 : conjugaison et recombinaison moléculaire.

L'addition de SGI1 dans les souches *S.*Typhimurium 1948Sa96ΔSGI1, *S.*Typhimurium 023277 *et S.*Typhimurium 024217 a été réalisée par des expériences de conjugaisons en milieu liquide comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes XIII.6.

Cependant, SGI1 étant un élément mobilisable intégratif, il requiert la présence d'un autre élément mobile capable de mettre en place l'appareil conjugatif. La stratégie utilisée a été de transférer SGI1 à partir d'une souche *E.coli* possédant non seulement SGI1 mais également le plasmide R55 qui est un plasmide conjugatif conférant, entre autres, une résistance à la kanamycine [68]. La mobilisation de SGI1 a donc requis plusieurs étapes préliminaires de conjugaison.

Nous avons tout d'abord introduit le plasmide R55 dans la souche *S.*Typhimurium 1948Sa96. Les souches ayant reçues le plasmide R55 ont été sélectionnées sur géloses LB additionnées de 50 µg/ml de kanamycine et de streptomycine => ***S.*Typhimurium 1948Sa96 R55**

Puis, SGI1 a été transféré vers une souche *E.coli* et les conjugants ont été sélectionnées sur géloses SS additionnées de 50 µg/ml de streptomycine. Les géloses SS permettent de différencier, par méthode chromogénique, les souches *E.coli* et *Salmonella* => ***E.coli* SGI1**

Enfin, le plasmide R55 a été introduit chez la souche *E.coli* SGI1 et les conjugants ont été sélectionnées sur géloses SS additionnées de 50 µg/ml de streptomycine et de kanamycine => ***E.coli* SGI1 R55.**

Cette dernière souche a permis le transfert de SGI1 vers les souches *S.*Typhimurium 1948Sa96ΔSGI1, *S.*Typhimurium 023277 et *S.*Typhimurium 024217. Notons que lors de la mobilisation de SGI1, le plasmide R55, qui a servi à mettre en place l'appareil conjugatif, ne se transfère pas simultanément à SGI1.

Les souches obtenues ont été nommées ***S.*Typhimurium DT104 023277 + SGI1, *S.*Typhimurium DT104 024217 + SGI1** et ***S.*Typhimurium 1948Sa96CSGI1.**

X.4 Vérification des souches testées.

Une série de PCRs a été réalisée afin de vérifier les caractéristiques moléculaires des souches construites ainsi que de celles fournies par l'INRA Nouzilly.

Les PCRs utilisant les amorces U7L12/LJR1, 104RJ/104D, 104RJ/C9L2, FwsodB/RvintSGI1, FwS044/RvpurR, circ1/circ2, 5'CS/3'CS, int1/aadA2, sulter/F3, F4/F6, tetR/tetA et In2/pse1 ont ainsi été effectuées (cf. XIII.4, PCRs n° 1 à 7 et 17 à 22). Elles permettent de détecter la présence de SGI1, de vérifier le nombre de copies insérées ainsi que le ou les sites d'intégration et également de vérifier la présence d'une région de multirésistance complète.

Les PCRs utilisant les amorces FwsodB/RvintSGI1 et FwS044/RvpurR permettent l'amplification des jonctions gauche et droite de SGI1 avec les gènes chromosomiques *sodB* et *purR* lorsque SGI1 est inséré au deuxième site d'intégration (cf. XIII.4, PCRs n° 6 à 7).

La présence d'une ou plusieurs copies de SGI1 est déterminée par la PCR utilisant les amorces circ1/circ2 correspondant à la zone de jonction entre deux structures de SGI1 organisées en tandem (cf. XIII.4 PCR n°10). Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant.

Nom de la souche	Origine	Présence de SGI1 (Nombre de copie)	Site(s) d'intégration
***S.*Typhimurium DT104 1948Sa96**	**Bovine**	**+ (1)**	***thdf***
***S.*Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1**	**Bovine**	**-**	**/**
***S.*Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1**	**Bovine**	**+ (>1)**	***thdf et sodB***
***S.*Typhimurium DT104 1948Sa96C2SGI1**	**Bovine**	**+ (1)**	***thdf***
***S.*Typhimurium DT104 024217**	**Humaine**	**-**	**/**
***S.*Typhimurium DT104 024217 + SGI1**	**Humaine**	**+ (1)**	***thdf***
***S.*Typhimurium DT104 023377**	**Humaine**	**-**	**/**
***S.*Typhimurium DT104 023377 +SGI1**	**Humaine**	**+ (1)**	***thdf***
***S.*Typhimurium LT2**	**Humaine**	**-**	**/**
***S.*Typhimurium LT2 + SGI1**	**Humaine**	**+ SGI1-F (>1)**	***thdf +sodB***
***S.*Enteritidis PT8**		**-**	**/**
***S.*Enteritidis PT8 + SGI1**		**+ (>1)**	***thdf***
***S.*Schwarzengrund**		**-**	**/**
***S.*Schwarzengrund + SGI1**		**+ SGI1-F (1)**	***thdf***
E.coli		**-**	**/**
***E.coli* + SGI1**		**+ (>1)**	***thdf***

Tableau 7 : Récapitulatif des caractéristiques des souches étudiées.

Notons que la souche ***S.*Typhimurium 1948Sa96CSGI1** construite possède plus d'une copie de SGI1 qui se sont intégrées soit au niveau de *thdf*, soit au niveau de *sodB*. Suite à ce constat, une autre expérience de conjugaison a été menée ultérieurement afin d'obtenir une souche ne possédant qu'une seule copie de SGI1. La souche obtenue a été nommée *S.*Typhimurium 1948Sa96C2SGI1.

Une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) a ensuite été réalisée pour vérifier le caractère isogénique des souches étudiées et la présence de SGI1. Cette vérification n'a été effectuée que sur les souches utilisées dans le modèle *in vivo* d'étude de la virulence.
Les ADN génomiques digérés avec l'enzyme *Bln*I ont été soumis à une migration en champ pulsé permettant l'obtention de profils PFGE (cf. Figure 55)

Les profils obtenus permettent de repérer les souches possédant SGI1 qui, comparativement à leurs homologues sans SGI1, présentent deux bandes additionnelles de bas poids moléculaires encadrées sur la Figure 55.

En dehors de ces bandes additionnelles, les souches isogèniques présentent des profils similaires excepté la souche ***S.*Typhimurium 1948Sa96CSGI1** qui présente un profil différent de ses homologues isogèniques. Cette différence peut être expliquée par la présence de plusieurs copies de SGI1 insérées à deux sites différents au sein de son génome.

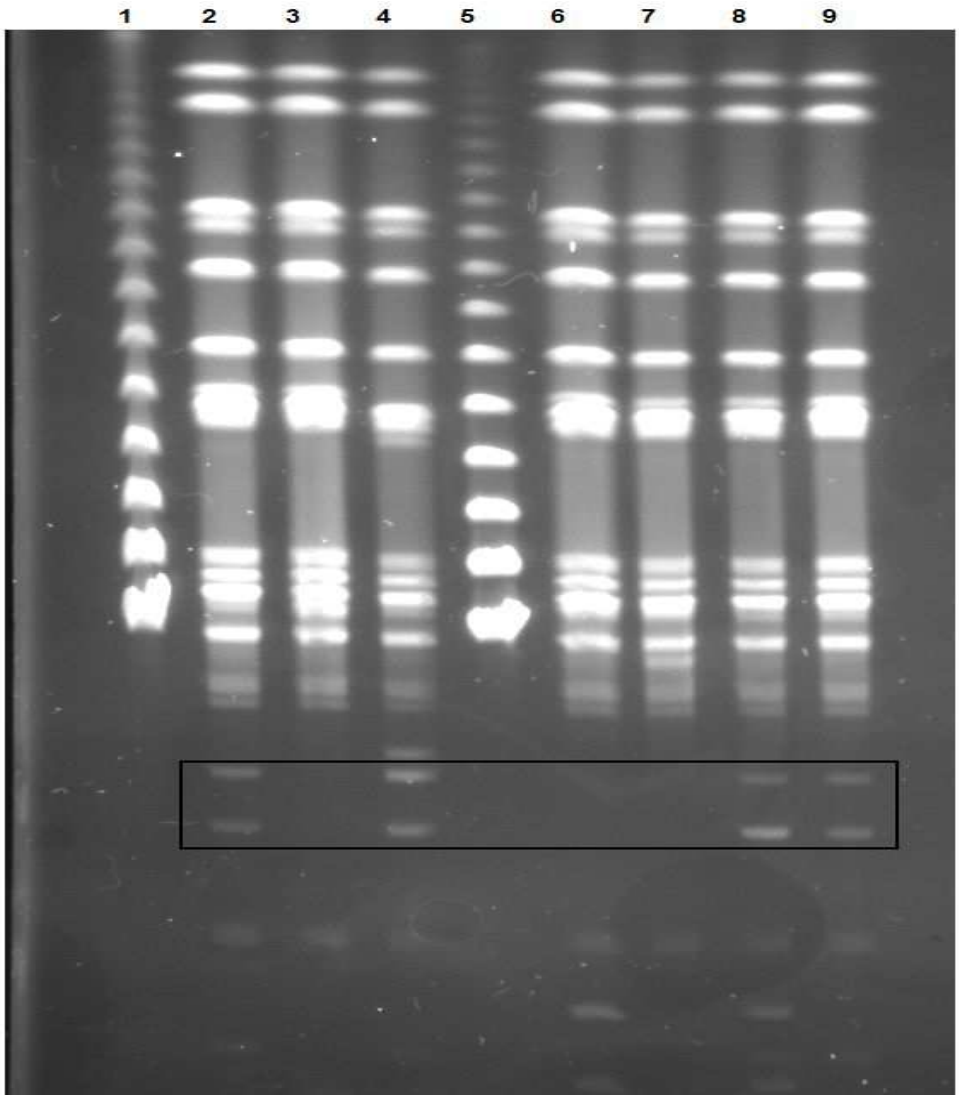


Figure 56 : Profils de restriction de l'ADN total digéré par l'enzyme *Bln*I de la souche *S.*Typhimurium 1948Sa96 (lane 2), *S.*Typhimurium 1948Sa96ΔSGI1 (lane 3), *S.*Typhimurium 1948Sa96CSGI1 (lane 4), *S.*Typhimurium 023277 (lane 6), *S.*Typhimurium 024217 (lane 7), *S.*Typhimurium 023277 + SGI1 (lane 8) et *S.*Typhimurium 024217 + SGI1 (lane 9). Lanes 1 et 5 Marqueurs de poids moléculaires.

XI. Rôle de Salmonella Genomic Island 1 dans la virulence.

Un des objectifs de la thèse a été de déterminer les raisons du succès épidémique des souches multi-résistantes *S*.Typhimurium DT104. Plusieurs hypothèses ont été proposées dont une qui met en relation le succès épidémique de ces souches avec une potentielle hypervirulence conférée par SGI1 (cf. IV.6)

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi d'utiliser le modèle murin qui constitue un modèle reconnu par la communauté scientifique internationale pour l'étude de la virulence des salmonelles. Le principe de l'étude réalisée est de tester la virulence de souches isogèniques ne différant que par la présence ou l'absence de SGI1 dans un modèle murin de salmonellose systémique.

Ce modèle nécessite l'utilisation d'animaux de phénotype sensible NRamp-/- pour lesquels les salmonelles provoquent une infection systémique létale. Deux paramètres ont été étudiés : le niveau de colonisation des rates au pic d'infection et la létalité.

XI.1 Détermination de la dose d'inoculation et du délai post-inoculation pour être au pic d'infection chez des souris BalbC inoculées par des souches Salmonella Typhimurium.

Une expérimentation préliminaire a été requise afin de déterminer quelle quantité de bactéries doit être inoculée pour observer les symptômes de la salmonellose systémique dans un délai relativement court. Cette expérimentation a également permis de déterminer le pic d'infection, jour auquel doivent être prélevées les rates des souris pour mesurer le taux de colonisation des salmonelles. Le pic d'infection se caractérise par la demi-journée précédant la mort potentielle des animaux. Le prélèvement des rates avant la mort est essentielle afin d'éviter des mesures erronées causées par la prolifération anarchique des bactéries post-mortem.

L'étude préliminaire ne nécessite pas de tester toutes les souches à étudier. Nous avons choisi de tester la souche qui possède hypothétiquement le phénotype de virulence le plus important, soit ***S*.Typhimurium DT104 1948Sa96.** Deux autres souches ont été ajoutées à l'étude : ***S*.Typhimurium DT104 024217** et ***S*.Typhimurium DT104 024217 + SGI1.**

Cinq souris par souche et par dose ont été utilisées car, en dessous de cinq souris, il risquerait de ne pas y avoir de lots pour lesquels 80 à 100% des souris sont infectées, rendant ainsi impossible une détermination claire de la dose à inoculer et du jour d'autopsie correspondant au pic d'infection.

Le protocole utilisé pour cette expérimentation préliminaire est décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes XV.1. Quatre doses ont été testées pour chaque souche : 10^5, 10^6 ,10^7 et 10^8 CFU.
Après inoculation par voie orale des inocula bactériens, l'évolution de l'infection est suivie. Les animaux sont visités quotidiennement tant que les souris ont une bonne activité. Dès que les souris sont atteintes de tremblements et qu'elles présentent une activité réduite, elles sont visitées deux fois par jour jusqu'à leur mort. Pendant cette période critique, les animaux en phase terminale sont euthanasiés lorsque l'on considère que l'animal décèdera dans la ½ journée suivante.

Cette première expérimentation a permis de déterminer la **dose d'inoculum** nécessaire afin d'obtenir une infection rapide des souris, soit **10^8 CFU.**
Le pic d'infection a été déterminé à six jours post inoculation **(J+6).**

XI.2 Evaluation du rôle l'îlot génomique SGI-1 de Salmonella Typhimurium dans la capacité de colonisation des rates et dans la létalité chez la souris à l'aide de mutants isogèniques.

Le protocole utilisé pour cette expérimentation est décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes XV.2. Chaque souche bactérienne a été inoculée, à une dose de 10^8 CFU, à deux lots composés chacun de 10 souris qui constitue le nombre minimum requis pour une analyse statistique ultérieure.

Le premier lot constitue **le lot « létalité »** pour lequel nous avons uniquement effectué un suivi quotidien du comportement des animaux et de la létalité.

Le deuxième lot constitue **le lot « colonisation des rates »** pour lequel une euthanasie des animaux a été réalisée au pic d'infection à J+6 post inoculation. La rate est prélevée de

manière aseptique sur chacun des animaux et le niveau de colonisation des rates est déterminé.

XI.2.1 Trio S.Typhimurium DT104 1948Sa96, S.Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1 et S.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1.

Pour le trio « 1948Sa96 », le suivi des animaux révèle une létalité beaucoup plus importante et précoce pour les souris inoculées avec la souche délétée de SGI1 (cf. Figure 56)
En effet, pour la souche *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1, 100% des souris sont mortes à J+9 post inoculation tandis que pour les souches *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96 et *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1, on observe respectivement des taux de létalité égal à 30% et 0% à J+11 post inoculation.

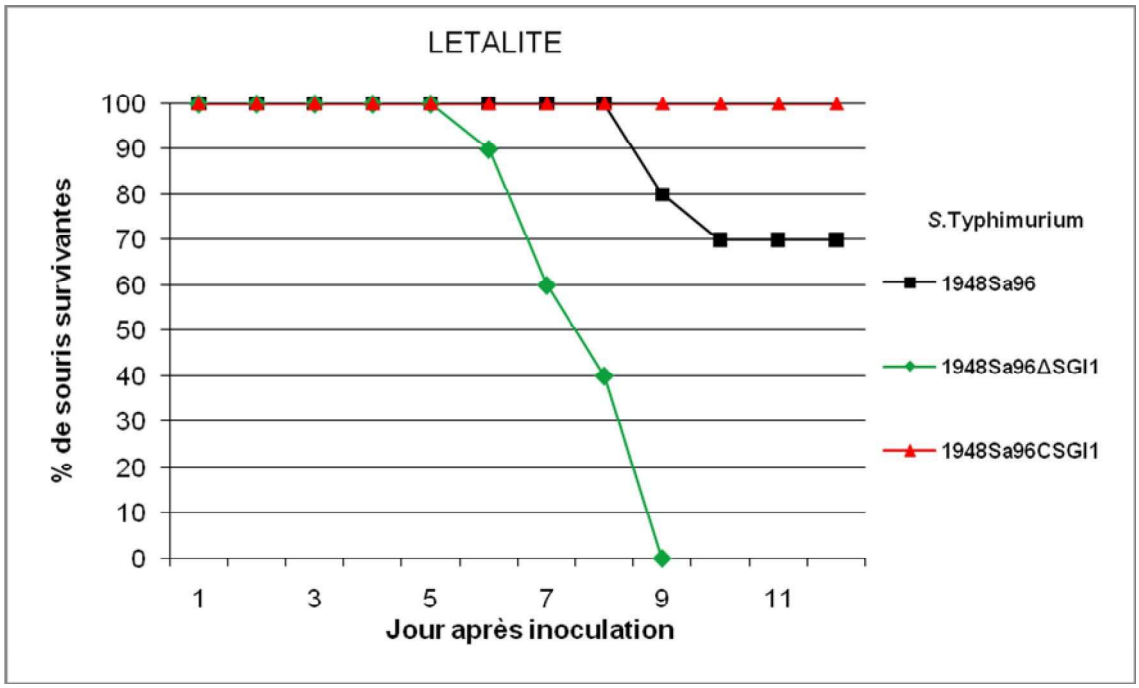


Figure 57 : Suivi de la létalité des souris inoculées avec les souches *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96, *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1 et *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1.

Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, on observe une virulence accrue pour la souche délétée de SGI1. Notons également que la souche *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1, qui possède plusieurs copies de SGI1, se révèle moins virulente que la souche *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96 qui n'en possède qu'une copie.

L'analyse des taux de colonisation des rates confirment le résultat précédent puisque les valeurs atteintes avec la souche sans SGI1 sont beaucoup plus importantes que celles obtenues avec les souches avec SGI1. Le taux de colonisation des rates a été quantifié en CFU par gramme de rate.

La souche *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1 présente un taux égal à 4.71^{E+07} +/- 3.21^{E+07} CFU/g tandis que les souches *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96 et *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1 présentent respectivement des taux égaux à 1.17^{E+05} +/- 6.63^{E+04} et 1.65^{E+03} +/- 6.75^{E+02}.

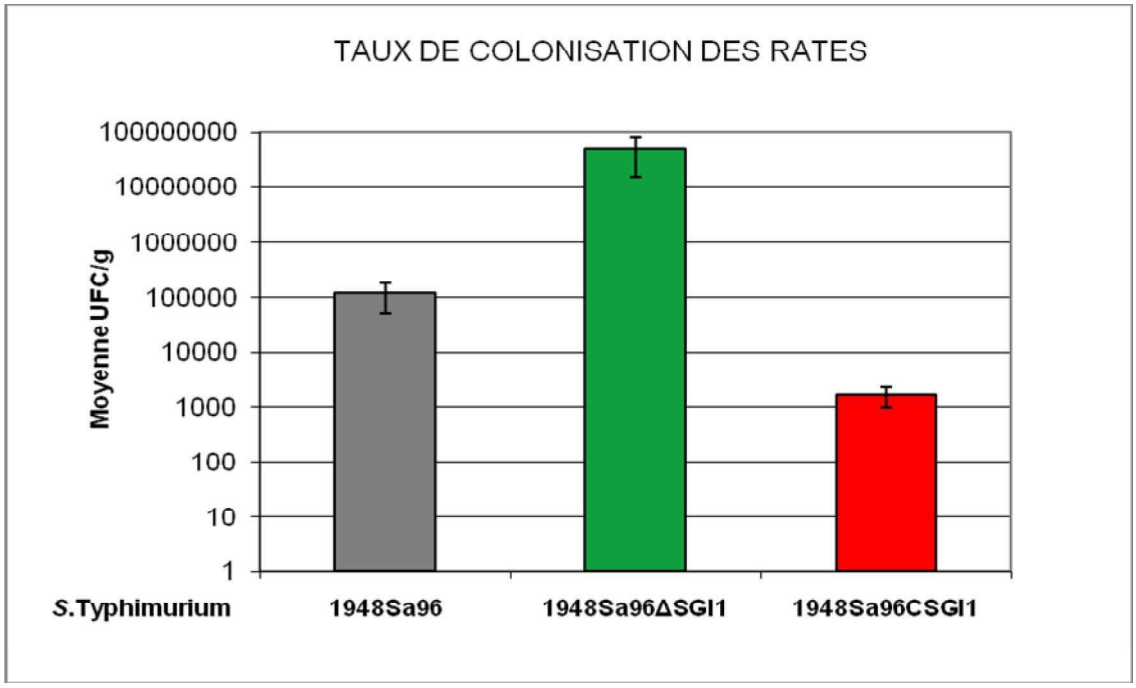


Figure 58 : Mesure du taux de colonisation des rates au pic d'infection après inoculation des souches *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96, *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1 et *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1.

Ici aussi, nous notons que la souche *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1, qui possède plusieurs copies de SGI1, engendre un taux de colonisation des rates moins important que la souche *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96 qui n'en possède qu'une copie.

XI.2.2 Couple S.Typhimurium 024217 et S.Typhimurium 024217 + SGI1.

Les résultats obtenus pour le couple *S*.Typhimurium 024217 et *S*.Typhimurium 024217 + SGI1 corrèlent avec ceux obtenus précédemment puisque la souche sans SGI1 engendre une létalité de 80% à J+11 post inoculation contre 0% à J+11 pour la souche avec SGI1.

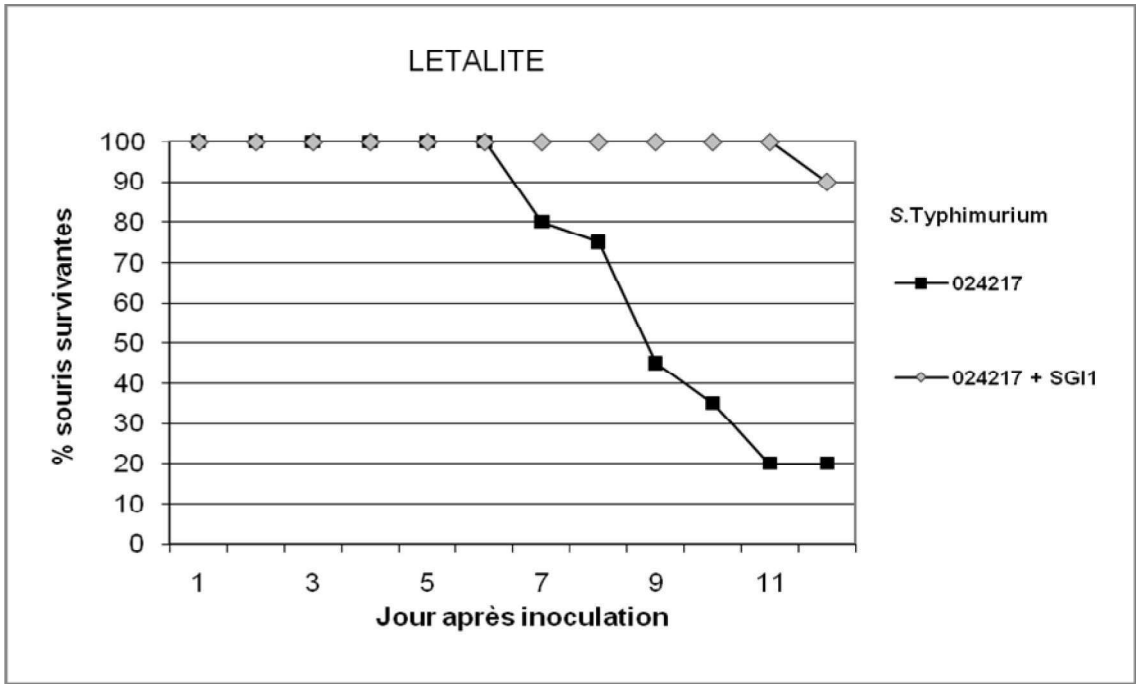


Figure 59 : Suivi de la létalité des souris inoculées avec les souches *S*.Typhimurium DT104 024217 et *S*.Typhimurium DT104 024217 + SGI1.

Les taux de colonisation des rates indiquent également une virulence accrue pour la souche ne possédant pas SGI1 puisqu'on obtient une valeur de 1.84^{E+06} +/- 7.97^{E+05} UFC/g pour la souche *S*.Typhimurium DT104 024217 contre 8.06^{E+04} +/- 7.76^{E+04} pour la souche *S*.Typhimurium 024217 + SGI1 (cf. Figure 59)

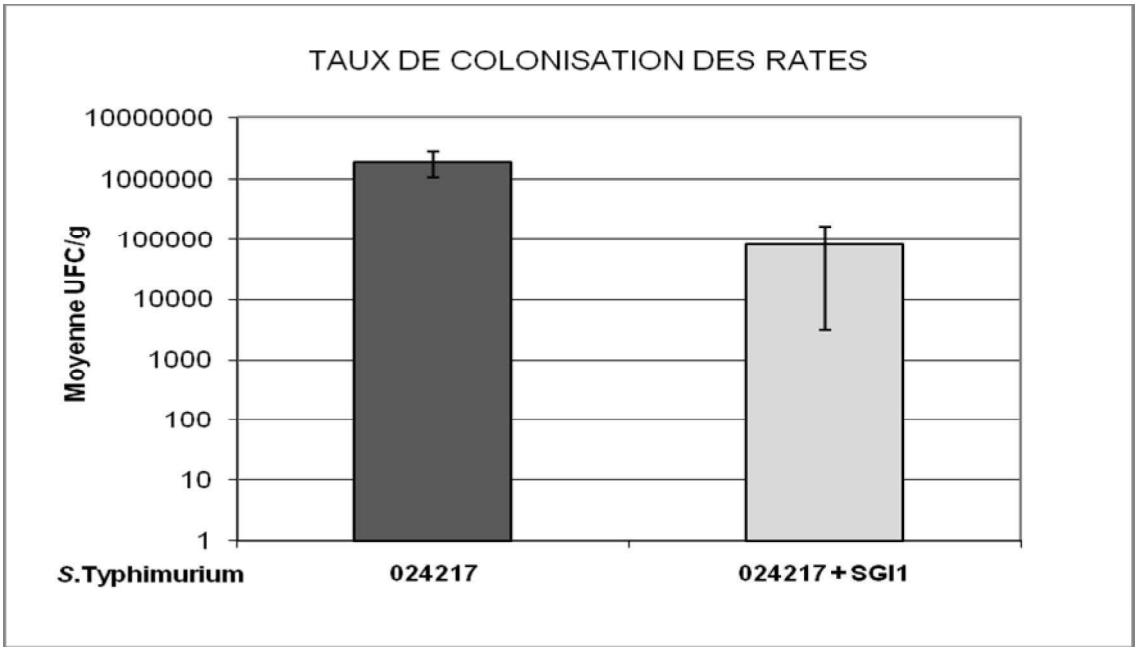


Figure 60 : Mesure du taux de colonisation des rates au pic d'infection après inoculation des souches *S*.Typhimurium DT104 024217 et *S*.Typhimurium DT104 024217 + SGI1.

XI.2.3 Couple S.Typhimurium 023277 et S.Typhimurium 023277 + SGI1

L'analyse des données obtenues avec le couple *S*.Typhimurium 023277 et *S*.Typhimurium 023277 + SGI1 n'indiquent pas de différence de virulence entre ces deux souches. L'étude révèle un taux de la létalité identique pour les deux souches et égal à 85% à J+11 post inoculation (cf. Figure 60)

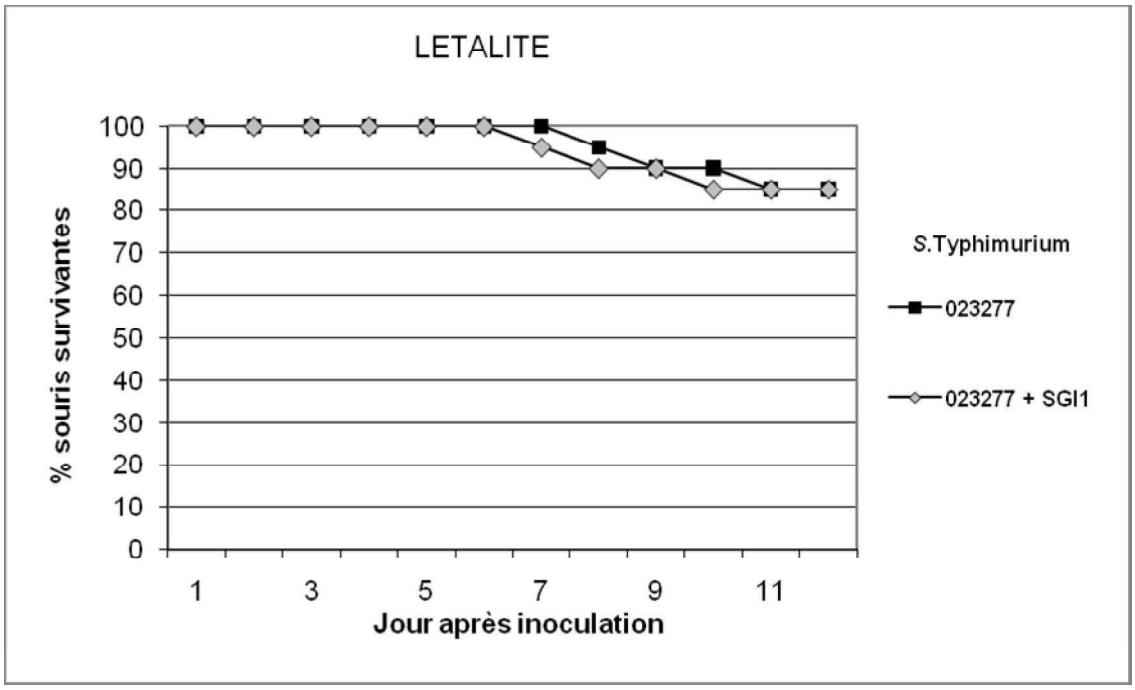


Figure 61 : Suivi de la létalité des souris inoculées avec les souches *S*.Typhimurium DT104 023277 et *S*.Typhimurium DT104 023277 + SGI1.

Parallèlement, les taux de colonisation obtenus sont également très similaires avec des valeurs égales à 1.03^{E+05} +/- 5.89^{E+04} pour la souche *S*.Typhimurium 023277 et 1.74^{E+05} +/- 1.06^{E+05} pour la souche *S*.Typhimurium 023277 + SGI1 (cf. Figure 61)

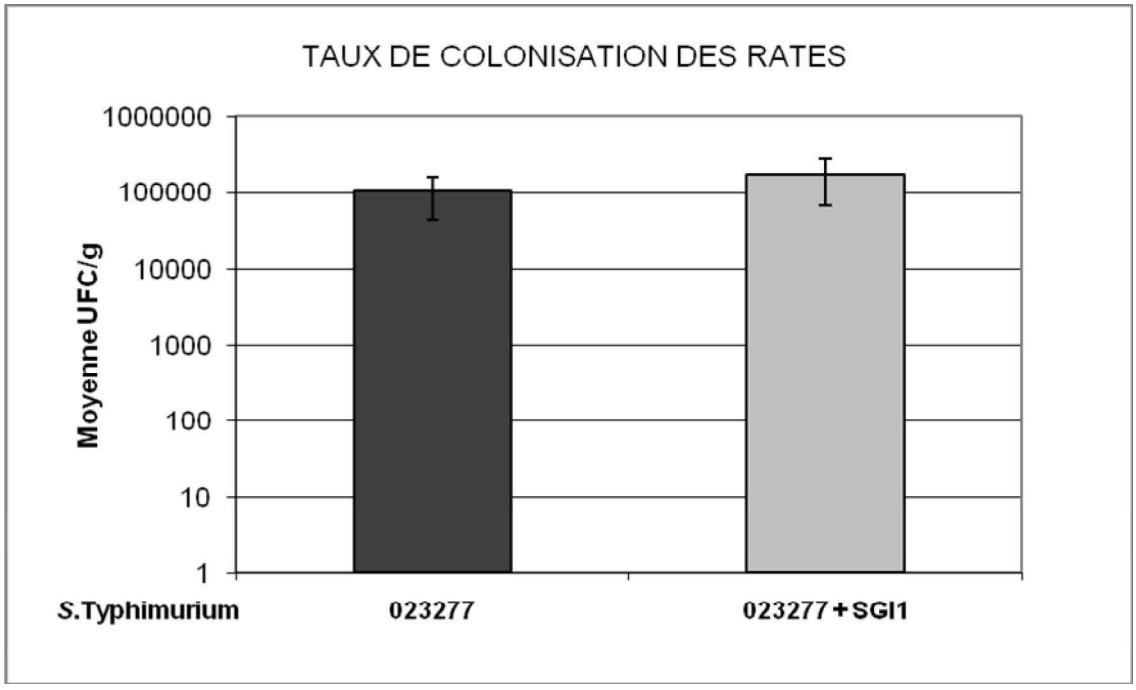


Figure 62 : Mesure du taux de colonisation des rates au pic d'infection après inoculation des souches *S.*Typhimurium DT104 023277 et *S.*Typhimurium DT104 023277 + SGI1.

XI.3 Analyse des données.

Deux cas de figure ont été observés. Pour le trio « 1948Sa96 » et le couple « 024217 », les souches possédant SGI1 révèlent une virulence amoindrie comparativement à leurs homologues sans SGI1. De plus, la souche *S.*Typhimurium 1948Sa96CSGI1 qui possède plus d'une copie de SGI1 se révèle être moins virulente que son homologue isogènique ne possédant qu'une copie.

Pour le couple « 023277 », les résultats indiquent une virulence comparable pour les souches avec ou sans SGI1. Cependant, lors des expérimentations animales, nous avons observé des symptômes atypiques chez les souris inoculées avec ces souches. Les souris présentaient des symptômes qui laissaient présumer une atteinte neurologique avec des troubles de locomotion et de comportement (souris avec tête penchée sur le coté type torticolis, problème à une patte, difficulté à marcher, souris qui tourne sur elle-même, désorientation, excitation). Elles présentaient également les troubles typiquement observés lors de salmonelloses mais dans une moindre mesure.

D'autre part, lors des comptages du nombre de colonies bactériennes présentes dans les rates, nous avons remarqué que certaines souches présentaient des colonies aux contours bien lisses tandis que d'autres formaient des colonies aux contours complètement irréguliers.
Cette irrégularité suggérait une potentielle altération du LPS qui a été vérifiée par des tests d'auto-agglutination en milieu NaCl car les souches bactériennes possédant un LPS tronqué ont la propriété d'auto-agglutiner.
Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant.

Nom de la souche.	Présence de SGI1 (nombre de copies)	Contours des colonies	LPS tronqué.	Virulence.
***S*.Typhimurium 1948Sa96**	**+ (1)**	**irréguliers**	**Oui**	**++**
***S*.Typhimurium 1948Sa96ΔSGI1**	**-**	**lisses**	**Non**	**+++**
***S*.Typhimurium 1948Sa96CSGI1**	**+ (>1)**	**irréguliers**	**Oui**	**+**
***S*.Typhimurium 023277**	**-**	**lisses**	**Non**	**+**
***S*.Typhimurium 023277 + SGI1**	**+ (1)**	**lisses**	**Non**	**+**
***S*.Typhimurium 024217**	**-**	**lisses**	**Non**	**+++**
***S*.Typhimurium 024217 + SGI1**	**+ (1)**	**irréguliers**	**Oui**	**+**

Tableau 8 : Caractéristiques des souches bactériennes isolées des prélèvements de rates.

Nous remarquons que les trois souches comportant un LPS tronqué correspondent aux trois souches arborant SGI1 qui présentaient une virulence amoindrie par rapport à leurs homologues sans SGI1. Or il a été démontré que les souches dites rough ou souches R en raison de l'aspect irrégulier de leurs colonies sont caractérisées par la perte de la région O de leurs LPS. Le polysaccharide O étant impliqué dans plusieurs processus responsables de la virulence bactérienne, les souches rough sont, en majorité, avirulentes ou moins virulentes que les souches dites « smooth » ou « lisses». Ce qui corrèle avec les résultats obtenus.

Cette observation soulève plusieurs questions :

- SGI1 est-il impliqué dans la formation de souches « rough » ?
- La perte de l'antigène O s'est elle produite à l'intérieur des animaux, lors de la préparation des inocula ou lors de manipulations antérieures ? Et dans ce cas, à quel niveau ?

L'observation des souches récupérées de la collection congelée confirme le phénotype rough des souches *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96CSGI1 et *S*.Typhimurium 024217 + SGI1. La souche *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96 présente un mélange de colonies aux phénotypes rough ou smooth. Ces résultats indiquent que la perte de l'antigène O s'est produite antérieurement aux expérimentations animales.

La perte de l'antigène O s'est produite exclusivement chez les souches possédant SGI1, suggérant une potentielle implication de SGI1 dans cet événement.

Le LPS jouant un rôle important dans la virulence, les résultats obtenus lors des expérimentations animales réalisées ne peuvent être exploitées en l'état. L'utilisation de souches aux LPS intègres est requise pour conclure sur le rôle de SGI1 dans la virulence.
Ainsi, les complémentations avec SGI1 des souches *S*.Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1 et *S*.Typhimurium 024217 ont été réitérées afin d'obtenir des souches lisses.

Par contrainte de temps dans le strict cadre de la thèse, les expérimentations animales n'ont pas pu être répétées avec les nouvelles souches construites. Elles le seront néanmoins dans le cadre de la poursuite de la collaboration entre les deux laboratoires. En revanche, elles ont pu être utilisées dans l'approche stratégique envisagée en parallèle du modèle rongeur, et visant à étudier le rôle de SGI1 dans la formation de biofilm décrite dans le chapitre suivant.

XII. Rôle de Salmonella Genomic Island 1 dans la formation de biofilm.

Entre deux épisodes infectieux, les souches bactériennes se retrouvent dans l'environnement et sont soumises à des contraintes physico-chimiques qui limitent leurs multiplications et leurs propagations. Certaines bactéries ont développé des systèmes de défense leurs permettant une résistance et une survie accrues dans les conditions environnementales. De précédentes études ont démontré que les souches *Salmonella* Typhimurium DT104, sous certaines conditions, sont capables de changer leurs expressions phénotypiques. A des températures inférieures à 30 °C, la coexpression de curli et de cellulose permet l'obtention d'un phénotype rugueux qui se caractérise principalement par une résistance accrue au chlorine, aux sels et au stress oxydatif. Les souches présentant ce phénotype rugueux ont également une capacité accrue à former des biofilms qui constituent une organisation efficace pour lutter contre les agressions extérieures.

Malcova et al [88] ont tenté de démontrer que SGI1 était impliqué dans la formation de biofilm. SGI1 représenterait alors un déterminant majeur dans le succès épidémique des souches DT104 car il favoriserait leurs survies dans l'environnement.
L'étude menée par Malcova a conclu sur un effet positif de SGI1 dans la formation de biofilm. Il faut cependant relativiser ce résultat car l'étude a consisté à comparer des souches avec ou sans SGI1, non isogéniques, pour lesquelles la production basale de biofilm peut être différente.
L'étude réalisée au cours de la thèse a consisté à déterminer l'implication de SGI1 dans la formation de biofilm et de confronter les conclusions émises par Malcova *et al* à celles issues d'approches plus expérimentales

XII.1 Etude comparative des souches 1948Sa96, 1948Sa96ΔSGI1et 1948Sa96C2SGI1.

Pour déterminer l'implication de SGI1 dans la formation de biofilm, nous avons réalisé une étude comparative des taux de biofilms produits par les souches *Salmonella* Typhimurium 1948Sa96, 1948Sa96ΔSGI1 précédemment décrites (cf. Chapitre X) et la souche1948Sa96C2SGI1 qui a été construite par complémentation d'une seule copie de SGI1

dans la souche 1948Sa96ΔSGI1. Ces trois souches sont isogèniques et ne diffèrent que par la présence ou l'absence de SGI1.

XII.1.1 Vérification des souches testées.

Avant de démarrer les expérimentations biofilms, quelques tests ont été réalisés afin de vérifier les caractéristiques des souches étudiées. L'observation morphologique des colonies formées par les trois souches précitées révèle des colonies aux contours lisses indiquant l'intégrité de leurs LPS. Les tests d'agglutinations, en solution NaCl, confirment ce résultat car aucune souche n'auto-agglutine. Enfin, des tests d'agglutination en sérum O 4,5, permettant de détecter une éventuelle perte de l'antigène O, ont donné des résultats positifs confirmant l'intégrité des LPS.

XII.1.2 Etude morphologique et test au calcofluor.

L'expression phénotypique des colonies formées par les trois souches étudiées a été observée après incubation 96 heures sur géloses TSA ou LB à 28 ou à 37°C (cf. Matériels et Méthodes XVI.3.1).

- A 37°C, les trois souches donnent toutes des colonies au phénotype lisse (cf. Figure 63, A).
- A 28°C, les résultats obtenus révèlent une nette différence de morphologie entre les souches avec ou sans SGI1. La souche 1948Sa96ΔSGI1 présente un phénotype lisse similaire à celui obtenu à 37°C tandis que les souches 1948Sa96 et 1948Sa96C2SGI1 présentent un phénotype rugueux (cf. Figure 63 B).

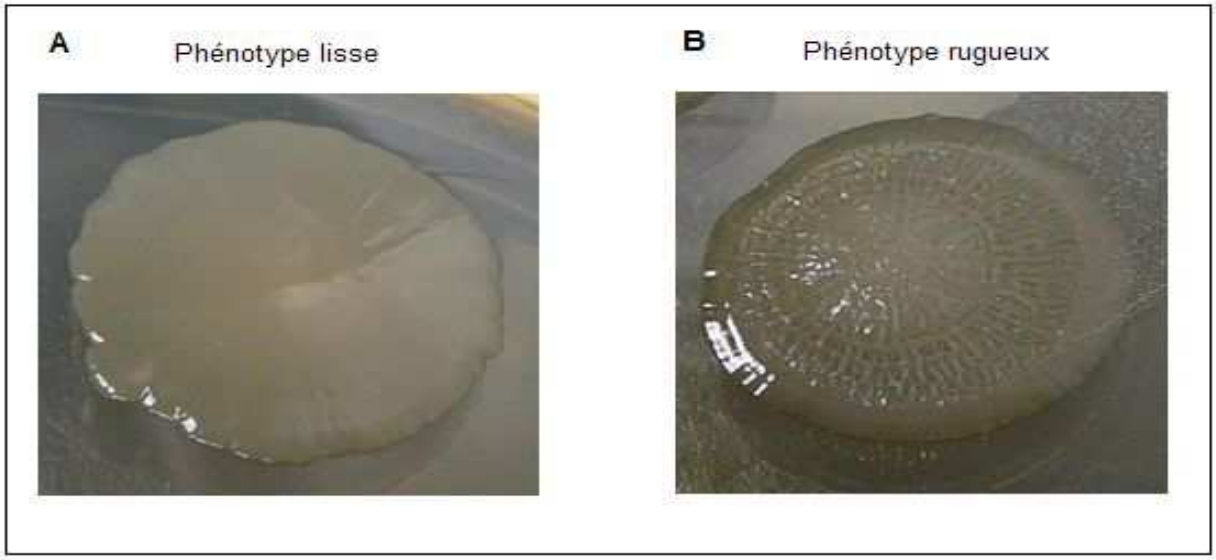


Figure 63 : Phénotypes observés à 28°C pour (A) la souche *S*.Typhimurium 1948Sa96ΔSGI1, (B) les souches *S*.Typhimurium 1948Sa96 et *S*.Typhimurium 1948Sa96C2SGI1.

Ces résultats confirment la capacité des souches *Salmonella* Typhimurium DT104 à développer un phénotype rugueux à des températures inférieures à 30°C. Ils mettent également clairement en évidence l'implication de SGI1 dans l'obtention de ce phénotype rugueux puisque, rappelons-le, les souches étudiées sont isogèniques et ne diffèrent que par la présence ou l'absence de SGI1.

Le phénomène de rugosité étant lié à la coexpression des curli et de la cellulose, nous avons procédé à une détection de la production de cellulose. Les souches ont été mises à incuber à 28 et à 37°C sur des boites de géloses LB supplémentées avec du calcofluor, un agent fluorescent capable de lier la cellulose.

Après 96 h, les boites ont été placées sous une source UV permettant la détection par fluorescence des colonies productrices de cellulose. Le lien établi entre rugosité et cellulose a ainsi été confirmé puisque toutes les colonies, présentant un phénotype rugueux, fluorescent.

Les résultats obtenus indiquent qu'un ou plusieurs éléments génétiques portés par SGI1 sont impliqués dans l'obtention du phénotype rugueux et par voie de fait dans la production de cellulose.

Chez *Salmonella* Typhimurium DT104, la cellulose est un des composants majeurs impliqués dans la formation de biofilms. Il constitue non seulement une adhésine primaire qui permet l'attachement initial aux surfaces, mais il représente également un des constituants majeurs de la matrice extracellulaire des biofilms. Ses caractéristiques physico-chimiques lui permettent de former un réseau avec d'autres polymères favorisant ainsi l'adhérence des cellules les unes aux autres.

XII.1.3 Mesure comparative des taux de biofilm produits.

Suite à l'étude morphologique, nous avons procédé à une mesure comparative des taux de biofilm produits par les trois souches isogèniques.
Trois méthodes différentes ont été utilisées afin d'assurer la fiabilité des résultats.

❖ Le premier système expérimental, également appelé **« essai en plaque 96 puits »** est une méthode simple permettant de contrôler et quantifier l'attachement de bactéries sur une surface abiotique (cf. Matériels et Méthodes XVI.4). Une suspension bactérienne de chaque souche est répartie dans 8 puits d'une plaque 96 puits et mise à cultiver 96 h à 28°C. L'attachement des cellules à la surface du puits leurs permet de produire un biofilm qui a été quantifié par une méthode colorimétrique indirecte. L'expérience a été reproduite six fois à des périodes différentes pour assurer la répétabilité des résultats.

Les taux de biofilms obtenus, quantifiés en DO, révèlent une production plus importante pour les deux souches arborant SGI1 (cf. Figure 64). Les souches *S.*Typhimurium 1948Sa96 et 1948Sa96C2SGI1 présentent respectivement des taux à 1.093 +/- 0.033 et 1.047 +/- 0.040 tandis que la souche 1948Sa96ΔSGI1 présente un taux égal à 0.934 +/- 0.052. L'analyse des données avec le Student's T-test indique que les différences obtenues sont significatives.

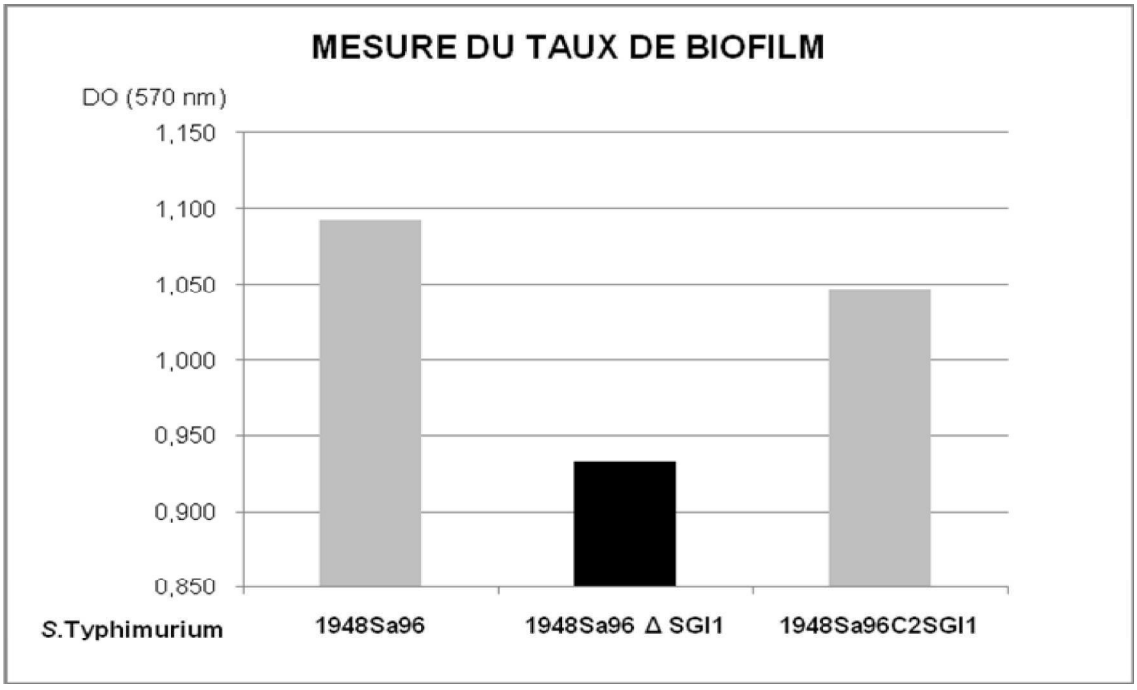


Figure 64 : Mesure comparative des taux de biofilm produits par les souches isogèniques *S*.Typhimurium 1948Sa96, 1948Sa96ΔSGI1 et 1948Sa96C2SGI1.

❖ Le deuxième système, nommé « **essai en plaque 24 puits** », est une méthode permettant de définir le pourcentage de cellules adhérentes dans une population de cellules mises dans des conditions de formation de biofilm (cf. Matériels et Méthodes XVI.5). Une suspension bactérienne de chaque souche est répartie dans quatre puits et mise à incuber 96 heures à 28°C. Les cellules qui n'ont pas adhéré à la surface des puits sont récupérées dans le surnageant tandis que les cellules adhérentes sont obtenues après grattage de la surface des puits et remises en solution. La mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 600 nm permet de quantifier le nombre de cellules présentes dans chacune des solutions afin d'établir le pourcentage des cellules adhérentes. Cette expérimentation a été réalisée trois fois à des périodes différentes pour assurer la répétabilité des résultats.

Les résultats obtenus indiquent un effet positif de SGI1 sur l'adhérence des souches puisque les souches 1948Sa96 et 1948Sa96C2SGI1 présentent respectivement des valeurs d'adhérence égales à 35.50 et 34.37% tandis que la souche 1948Sa96ΔSGI1 présente une valeur d'adhérence égale à 32.2 % (cf. Figure 65).

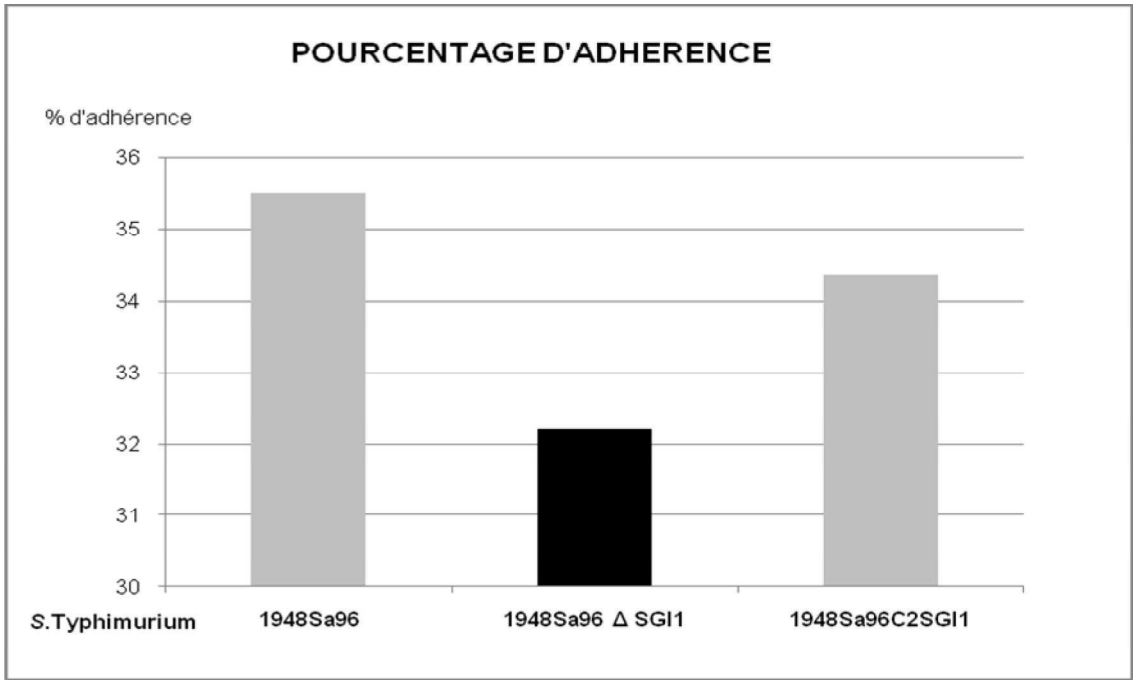


Figure 65 : Mesure comparative des pourcentages d'adhérence des souches isogèniques *S*.Typhimurium 1948Sa96, 1948Sa96ΔSGI1 et 1948Sa96C2SGI1.

❖ Le troisième système nommé **« enzyme-linked lectinsorbent assay » (ELLA)** permet la mesure du polysaccharide capsulaire qui est proportionnel à la quantité de biofilm produit, puisque, chez *Salmonella* Typhimurium DT104, le polysaccharide capsulaire est un des trois composants majeurs de la matrice extracellulaire des biofilms (cf. Matériels et Méthodes XVI.6)

Une suspension bactérienne de chaque souche est répartie dans deux puits d'une plaque 96 puits et mise à incuber 96h à 28°C. L'absorbance est mesurée à 600 nm pour quantifier le nombre de cellules composant chaque puits. La concanavalin A, marquée à la peroxydase, est alors additionnée pour lier spécifiquement le polysaccharide capsulaire produit par les cellules. Après plusieurs lavages et addition du substrat de la peroxydase, la mesure à 405 nm de l'absorbance obtenue permet une quantification du polysaccharide capsulaire. L'absorbance mesurée à 405 nm est ensuite divisée par l'absorbance mesurée à 600 nm pour obtenir la production de polysaccharide capsulaire par cellule.

Les résultats obtenus indiquent que les souches possédant SGI1 produisent une quantité de biofilm plus importante. Les souches *S*.Typhimurium 1948Sa96 et 1948Sa96C2SGI1 présentent un rapport de DO identique et égal à 4.50 tandis que la souche 1948Sa96ΔSGI1 présente une valeur égale à 3.25 (cf. Figure 66).

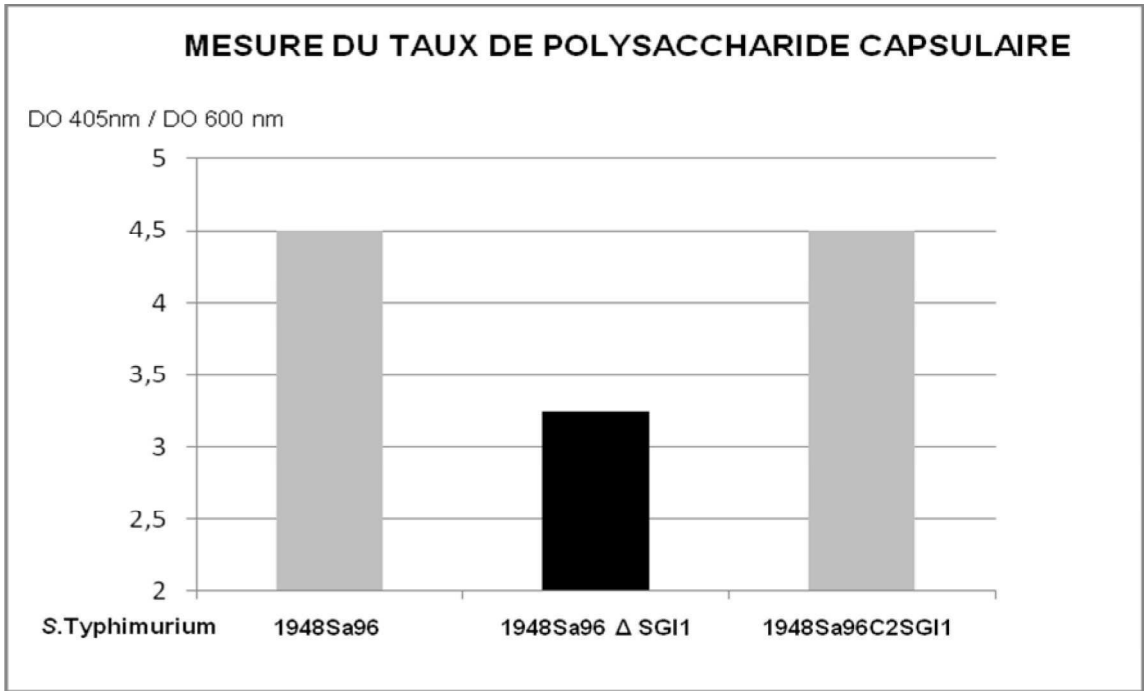


Figure 66 : Mesure comparative des taux de polysaccharide capsulaire produits par les souches isogèniques *S.*Typhimurium 1948Sa96, 1948Sa96ΔSGI1 et 1948Sa96C2SGI1.

En conclusion, trois méthodes différentes ont permis de mettre en évidence l'effet positif de SGI1 sur l'adhérence des cellules et la production de biofilm. Cette étude confirme les résultats obtenus par Malcova et al.

Un ou plusieurs éléments génétiques portés par SGI1 permettent une régulation positive de la production de biofilm. Or la formation de biofilm est régulée par un ensemble de chaines réactionnelles complexes faisant intervenir de nombreux gènes. Le rôle de SGI1 au sein de cette signalisation reste difficile à déterminer. Cependant un élément de réponse est peut être apporté par l'étude morphologique des colonies qui a permis de démontrer le rôle positif de SGI1 dans la production de cellulose. Il est possible que la production accrue de biofilm observée soit simplement le résultat d'une régulation positive de la production de cellulose. Ou qu'un même élément génétique présent sur SGI1 permette une régulation à la fois de la formation de biofilm et de cellulose. Ou encore que les productions accrues de biofilms et de cellulose mettent en jeu des systèmes de régulations totalement indépendants mais tous deux présents sur SGI1.

Le « Quorum Sensing » constitue une signalisation intercellulaire permettant la formation de biofilm et dont on a montré qu'elle régulait la production de cellulose. Pour déterminer si

SGI1 porte un gène impliqué dans le « Quorum Sensing », nous avons procédé à une mesure de la motilité bactérienne également régulée par cette signalisation.

XII.1.4 Mesure comparative de la motilité.

Il existe différent types de motilité qui mettent en jeu des structures différentes incluant les flagelles et les pili de type IV. Les tests que nous avons effectués permettent de mettre en évidence une motilité bactérienne nommée « swimming » qui résulte de la présence et de l'activation de flagelles.

Une suspension bactérienne de chaque souche est inoculée 2 à 3 mm sous la surface d'une gélose molle LB à 0.5%. Les cellules motiles se déplacent alors de manière circulaire créant un halo clair autour du point d'inoculation (cf. Figure 67)

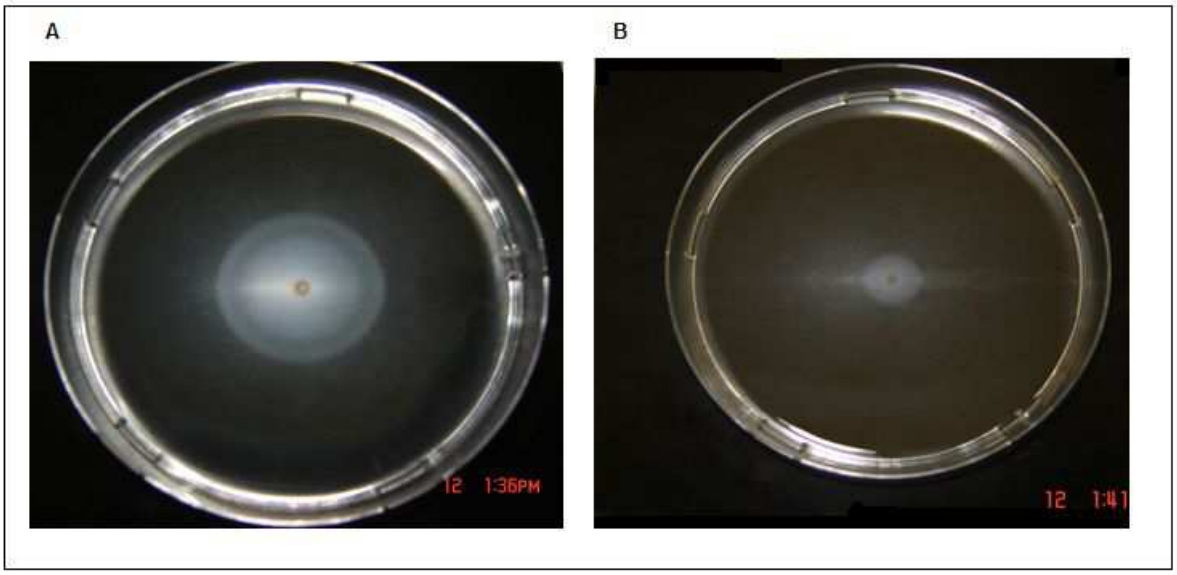


Figure 67 : Observation des boites de géloses LB 0.5% inoculées avec les souches A) *S*.Typhimurium 1948Sa96, B) *S*.Typhimurium 1948Sa96ΔSGI1.

L'observation des boites a été effectuée après 4, 6 et 8 h d'incubation à 37°C et les diamètres des cercles décrits par les cellules bactériennes ont été mesurés. Les expériences ont été répétées trois fois à des périodes différentes pour assurer la répétabilité des résultats.

Les résultats indiquent une motilité bien supérieure pour les souches portant SGI1 comparativement à celle qui en est délétée (cf. Figure 68) et appuie ainsi l'hypothèse de l'implication de SGI1 dans le quorum sensing.

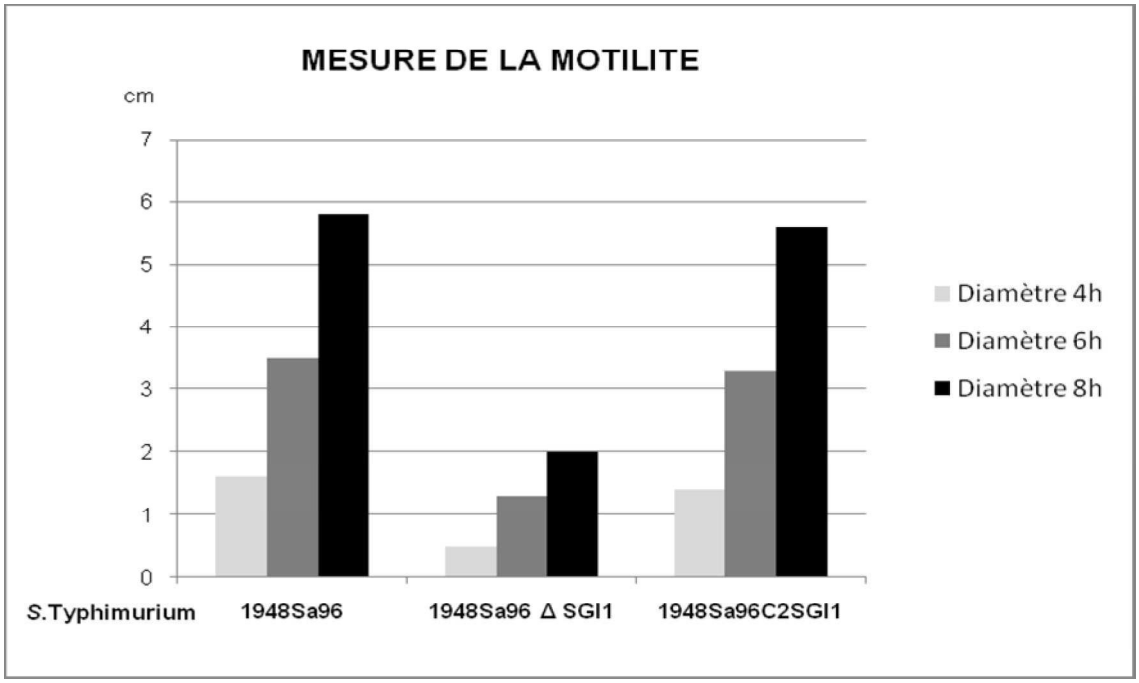


Figure 68 : Mesure de la motilité bactérienne des souches isogèniques *S.*Typhimurium 1948Sa96, 1948Sa96ΔSGI1 et 1948Sa96C2SGI1.

XII.2 Etude comparative d'un panel diversifié de souches isogèniques avec ou sans SGI1.

Pour appuyer les conclusions tirées de l'étude des souches isogèniques « 1948Sa96 », nous avons réalisé les mêmes expériences sur un panel de souches comprenant le trio précédent additionné de différents serovars de salmonelles comprenant zéro, une ou plusieurs copies de SGI1, insérés à différents sites d'intégration. Une souche *E.coli* a également été ajoutée à l'étude. La construction de ces différentes souches a été décrite dans le chapitre X.

XII.2.1 Vérification des souches testées.

Comme pour le trio « 1948Sa96 », les souches sont soumises à une observation des contours de leurs colonies et des tests d'agglutinations. La détection d'une éventuelle perte de

l'antigène O du LPS a cependant requis l'utilisation de différents sérums O correspondant aux différents sérovars (cf.I.1.3)

Toutes les souches testées présentent un LPS intègre car elles présentent des colonies aux contours lisses, ne sont pas auto-agglutinables en milieu NaCl et agglutinent en présence du sérum O leur correspondant.

XII.2.2 Etude morphologique et détection de la cellulose.

L'observation morphologique des colonies formées par les différentes souches a été réalisée comme précédemment décrite.

- A 37°C toutes les souches présentent un phénotype lisse.
- A 28°C, les résultats sont beaucoup plus hétérogènes et les colonies présentent soit le phénotype lisse, soit le phénotype rugueux. (cf. Figure 57). Chaque souche a également été soumise au test au calcofluor pour tester leurs capacités à produire de la cellulose à 28°C (cf. tableau 9).

Nom de la souche	Phénotype à 37°C	Phénotype à 28°C	Test au calcofluor
***S*.Typhimurium DT104 1948Sa96**	**Lisse**	**Rugueux**	**+**
***S*.Typhimurium DT104 1948Sa96ΔSGI1**	**Lisse**	**Lisse**	**+/-**
***S*.Typhimurium DT104 1948Sa96C2SGI1**	**Lisse**	**Rugueux**	**+**
***S*.Typhimurium DT104 024217**	**Lisse**	**Lisse**	**-**
***S*.Typhimurium DT104 024217 + SGI1**	**Lisse**	**Lisse**	**-**
***S*.Typhimurium DT104 023377**	**Lisse**	**Lisse**	**-**
***S*.Typhimurium DT104 023377 +SGI1**	**Lisse**	**Lisse**	**-**
***S*.Typhimurium LT2**	**Lisse**	**Lisse**	**+/-**
***S*.Typhimurium LT2 + SGI1**	**Lisse**	**Rugueux**	**+**
***S*.Enteritidis PT8**	**Lisse**	**Lisse**	**-**
***S*.Enteritidis PT8 + SGI1**	**Lisse**	**Lisse**	**-**
***S*.Schwarzengrund**	**Lisse**	**Lisse ou Rugueux**	**+/-**

***S*.Schwarzengrund + SGI1**	**Lisse**	**Lisse ou Rugueux**	**+/-**
E.coli	**Lisse**	**Lisse**	**-**
E.coli + SGI1	**Lisse**	**Lisse ou Rugueux**	**-**

Tableau 9 : Résultats de l'étude morphologique et du test au calcofluor des souches du panel.

Les résultats obtenus permettent d'établir un premier constat : **la présence de SGI1 dans une souche n'influe pas toujours sur son expression phénotypique et notamment sur l'obtention du phénotype rugueux.** Nous notons, en effet, que certaines souches possédant SGI1 n'ont pas la capacité de former le phénotype rugueux à 28°C.

Deux groupes de souches peuvent être dégagées des résultats.

❖ **Le premier groupe** est constitué des couples pour lesquels aucune souche ne forme de phénotype rugueux que ce soit à 37 ou à 28°C, avec ou sans SGI1. Il s'agit des souches ***S*.Typhimurium 024217/ 024217+SGI1**, ***S*.Typhimurium 023377/ 023377+SGI1** et ***S*.Enteritidis PT8/ PT8 +SGI1**. L'absence de production de cellulose est confirmée par le test au calcofluor.

❖ **Le deuxième groupe** est constitué des couples ou trio possédant au moins une souche présentant le phénotype rugueux à 28°C. Il s'agit des souches ***S*.Typhimurium 1948Sa96/ 1948Sa96ΔSGI1/ 1948Sa96C2SGI1, *S*.Typhimurium LT2/ LT2 +SGI1, S.Schwarzengrund/ S.Schwarzengrund +SGI1 et *E.coli* R55/ *E.coli* R55+SGI1.**

Les souches appartenant au deuxième groupe présentent toutes des phénotypes lisses à 37°C. SGI1 semble jouer un rôle dans la formation du phénotype rugueux car ce dernier n'est observé que chez les souches possédant SGI1, exception faite du couple *S*.Schwarzengrund/ S.Schwarzengrund +SGI1 dont les souches présentent toutes deux un mélange de colonies aux phénotypes lisses ou rugueux.

En dehors du couple *E.coli* R55/ *E.coli* R55+SGI1, toutes les souches du deuxième groupe présentent des colonies fluorescentes lors du test au calcofluor indiquant leurs capacités à produire de la cellulose. Les souches possédant SGI1 présentent cependant un nombre beaucoup plus important de colonies fluorescentes indiquant une production accrue de cellulose.

Les résultats de ces tests permettent de nuancer les premières conclusions tirées de l'étude du trio « 1948Sa96 ». **Ils confirment l'implication de SGI1 dans la formation du phénotype rugueux et la production accrue de cellulose.** Cependant, il semblerait que les éléments de régulation codés par SGI1 nécessitent un fond génétique particulier qui n'est pas fourni par le génome des souches du premier groupe.

XII.2.3 Evaluation du rôle de SGI1 dans la formation de biofilm.

Une mesure comparative des taux de biofilm produits par les souches du panel a été réalisée avec un essai en plaque 96 puits comme précédemment décrit pour le trio « 1948Sa96 ».
L'opération a été répétée six fois à des périodes différentes pour assurer la répétabilité des résultats qui sont récapitulés dans la figure suivante.

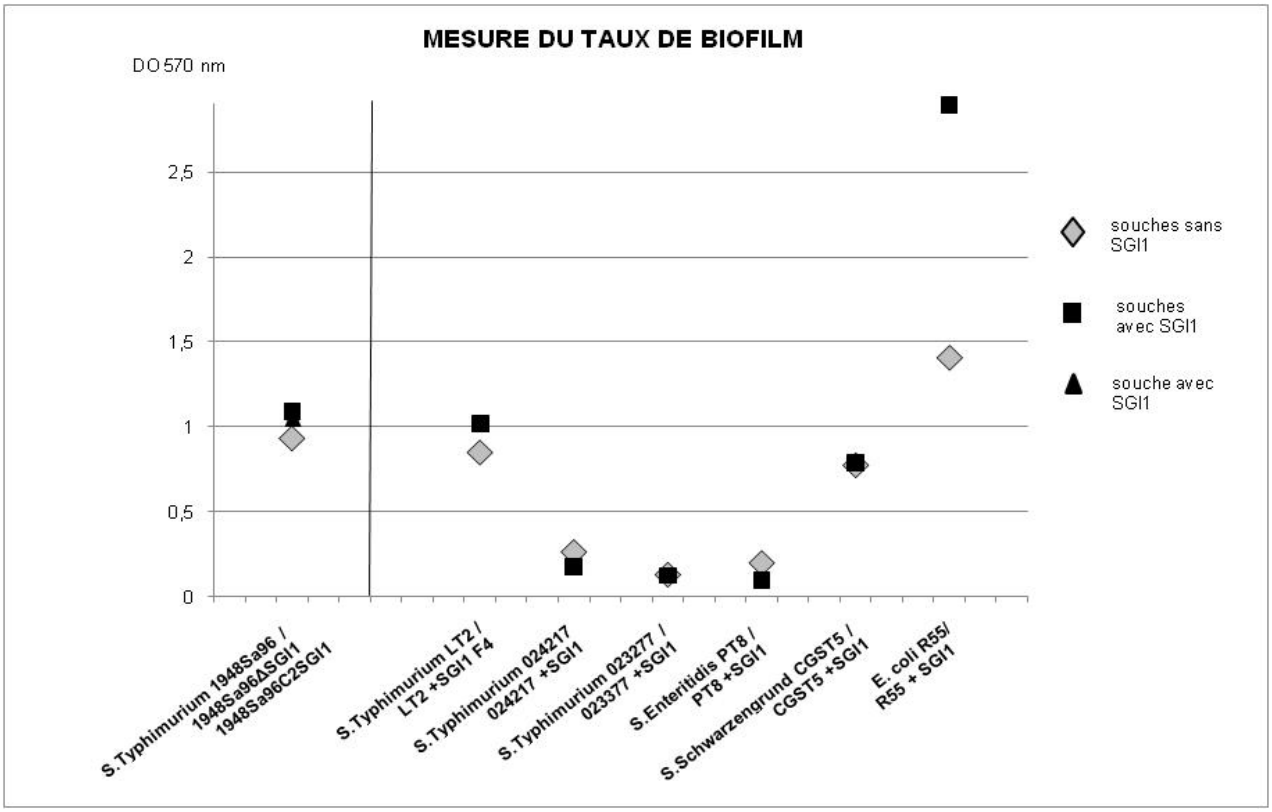


Figure 69 : Mesure comparative des taux de biofilm produits par les différents couples de souches isogèniques du panel.

L'analyse des données permet de définir deux groupes distincts qui correspondent à ceux définis précédemment par l'étude morphologique. La significativité des différences observée a été analysée avec le Student's T-test.

❖ **Le premier groupe** constitué des souches ***S*.Typhimurium 024217/ 024217+SGI1**, ***S*.Typhimurium 023377/ 023377+SGI1** et ***S*.Enteritidis PT8/ PT8 +SGI1** présentent des taux de biofilm très bas et inférieur à une DO de 0,5. Concernant l'influence de SGI1 sur la production de biofilm, deux cas de figure sont observés:

■ Pour le couple ***S*.Typhimurium 023377/ 023377+SGI1,** la production de biofilm est **identique** avec ou sans SGI1.

■ Pour les couples et trio ***S*.Typhimurium 024217/ 024217+SGI1**, et ***S*.Enteritidis PT8/ *S*.Enteritidis PT8 +SGI1**, la production de biofilm est légèrement **inférieure** avec SGI1.

❖ **Le deuxième groupe** constitué des souches ***S*.Typhimurium 1948Sa96/ 1948Sa96ΔSGI1/ 1948Sa96C2SGI1**, ***S*.Typhimurium LT2/ LT2 +SGI1**, **S.Schwarzengrund/ S.Schwarzengrund +SGI1**, ***E.coli* R55/ *E.coli* R55+SGI1** présentent des taux de biofilm élevés avec des valeurs de DO supérieures à 0,5. Ici aussi, deux cas de figure sont observés :

■ Pour les couples ou trio ***S*.Typhimurium 1948Sa96/ 1948Sa96ΔSGI1/ 1948Sa96C2SGI1**, ***S*.Typhimurium LT2/LT2 + SGI1**, ***E.coli* R55/ *E.coli* R55 + SGI1**, la production de biofilm est **supérieure** pour les souches possédant SGI1.

■ Pour le couple ***S*.Schwarzengrund/ *S*.Schwarzengrund +SGI1**, la production est **quasi-identique**.

Deux conclusions sont à tirer de ces résultats.

Le premier groupe correspond aux souches dont nous avons montré qu'elles ne présentaient pas de phénotype rugueux à 28°C et qui ne produisaient pas de cellulose. **Les essais en plaques 96 puits confirment le rôle crucial de la cellulose dans la formation de biofilm** puisque les souches du premier groupe donnent des taux de biofilm très bas.

Le deuxième groupe, constitué des couples et trio dont nous avons montré la capacité à produire de la cellulose, donne des taux de biofilms importants. De plus, soulignons que les souches de ce groupe possédant SGI1 présentaient un phénotype rugueux à 28°C et produisaient une quantité plus importante de cellulose comparativement aux souches sans SGI1 (**excepté le couple *S*.Schwarzengrund/ *S*.Schwarzengrund +SGI1**). Les mesures des taux de biofilm corrèlent parfaitement avec les observations précédemment faites puisque **les souches du deuxième groupe possédant SGI1 produisent un taux de biofilm plus important comparativement aux souches sans SGI1.** Notons que le couple *S*.Schwarzengrund/ *S*.Schwarzengrund +SGI1, dont la production de cellulose semblait identique, donne également des taux de biofilm presque similaire.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons procédé au test « Enzyme-linked lectinsorbent Assay » (ELLA) qui permet une mesure indirecte du taux de biofilm. Les suspensions bactériennes correspondant à chaque souche ont été réparties dans deux puits. Les expériences ont été répétées quatre fois afin d'assurer la répétabilité des résultats résumés dans la figure ci-dessous.

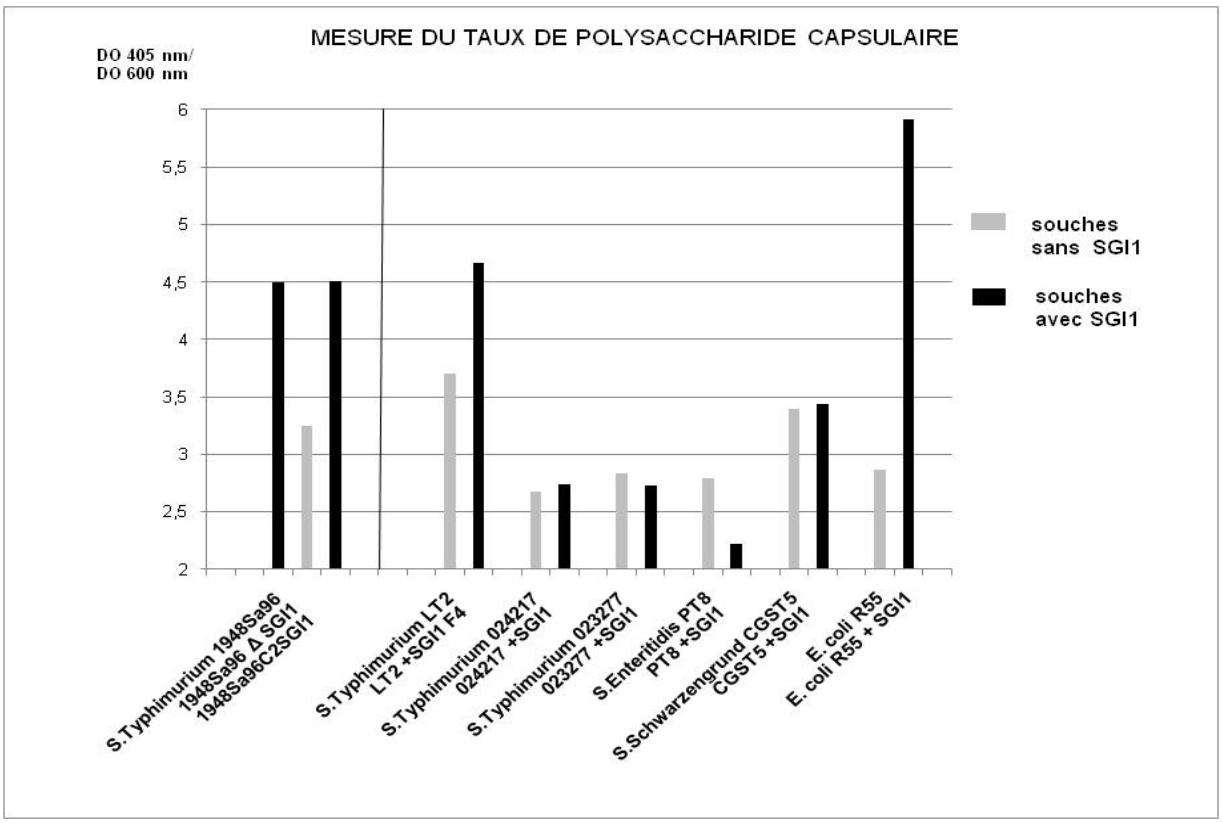


Figure 70 : **Mesure comparative des taux de polysaccharide capsulaire produits par les différents couples de souches isogèniques du panel.**

Les résultats obtenus avec le test ELLA corrèlent avec ceux obtenus en plaques 96 puits. Deux groupes se distinguent :

❖ **Le premier groupe** est constitué des souches ***S*.Typhimurium 024217/ 024217+SGI1, *S*.Typhimurium 023377/ 023377+SGI1 et *S*.Enteritidis PT8/ PT8 +SGI1** qui présentent des valeurs de DO basses.

■ Les souches appartenant aux couples ***S*.Typhimurium 024217/ 024217+SGI1** et ***S*.Typhimurium 023377/ 023377+SGI1** présentent des valeurs similaires avec ou sans SGI1.

■ Pour le couple ***S*.Enteritidis PT8/ PT8 +SGI1**, la souche hébergeant SGI1 présente une valeur de DO plus faible.

❖ **Le deuxième groupe** constitué des souches ***S*.Typhimurium 1948Sa96/ 1948Sa96ΔSGI1/ 1948Sa96C2SGI1, *S*.Typhimurium LT2/ LT2 +SGI1, *S*.Schwarzengrund/ *S*.Schwarzengrund +SGI1** et ***E.coli* R55/ *E.coli* R55+SGI1** présentent des taux de biofilm élevés comparativement à ceux du premier groupe.
De plus, **on observe un effet positif de SGI1 sur la production de biofilm excepté pour le couple S.Schwarzengrund/ S.Schwarzengrund +SGI1** dont les souches présentent une production de polysaccharide capsulaire quasi-identique.

XII.2.4 Evaluation du rôle de SGI1 dans le quorum sensing.

Les tests de motilité effectués sur le trio « 1948Sa96 » avaient permis de conclure que SGI1 était bien impliqué dans le quorum sensing. Pour appuyer ce résultat, le même test a été réalisé sur les souches du panel. Les expériences ont été reproduites trois fois à des périodes différentes afin d'assurer la répétabilité des résultats.

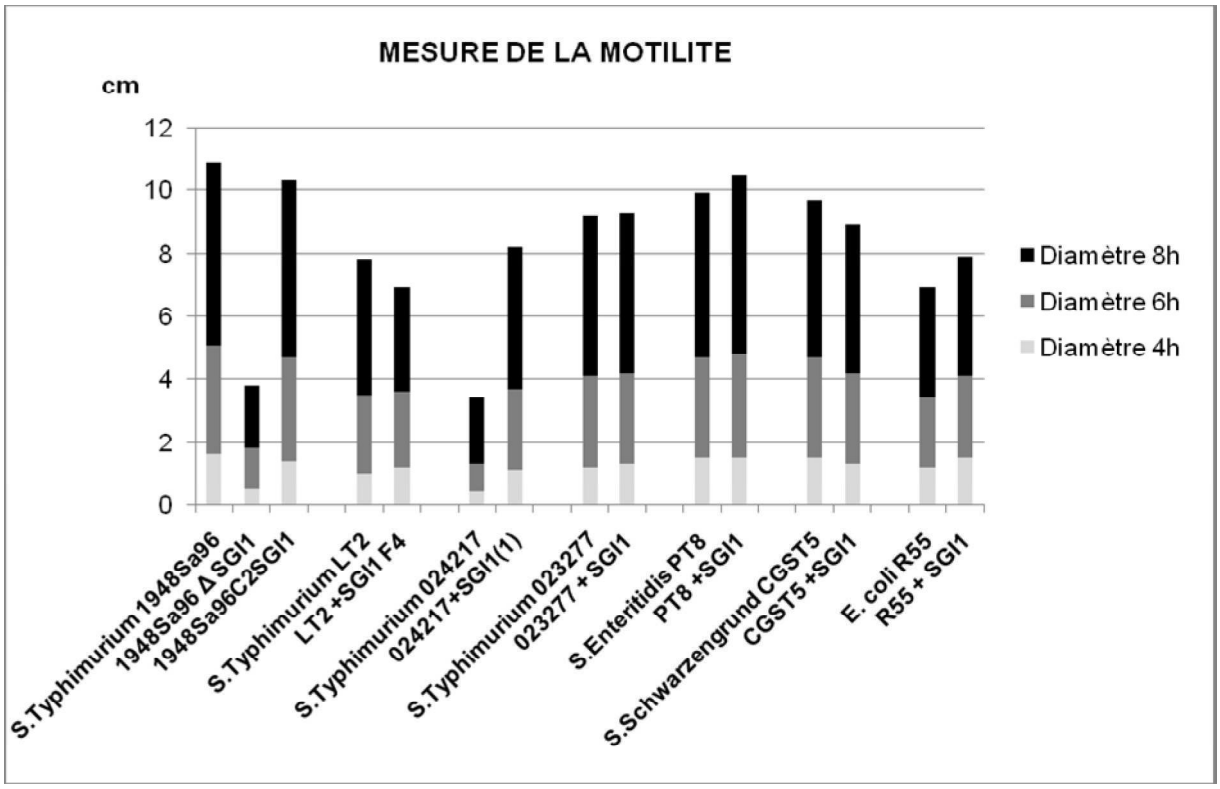


Figure 71 : Mesure comparative de la motilité bactérienne par les différents couples de souches isogèniques du panel.

Les résultats obtenus sont très hétérogènes et ne permettent pas de faire de recoupements avec les tests de production de biofilm.

- Pour les couples et trio ***S*.Typhimurium 1948Sa96/ 1948Sa96ΔSGI1/ 1948Sa96C2SGI1, *S*.Typhimurium 024217/ 024217+SGI1** et ***E.coli* R55/ *E.coli* R55+SGI1**, la présence de SGI1 coïncide avec une motilité accrue.
- Pour les couples ***S*.Typhimurium 023377/ 023377+SGI1** et ***S*.Enteritidis PT8/ PT8 +SGI1**, la présence de SGI1 n'entraine pas d'effet notable sur la motilité.
- Pour les couples ***S*.Typhimurium LT2/ LT2 +SGI1** et ***S*.Schwarzengrund/ *S*.Schwarzengrund +SGI1**, nous observons une très légère baisse de motilité pour les souches possédant SGI1.

Soulignons simplement qu'au sein de couples ou trio de souches isogèniques ne différant que par la présence ou l'absence de SGI1, des différences de motilité sont observées indiquant une implication de SGI1 dans ce processus.

XII.3 Analyse des données.

Les tests effectués sur le panel de souches a permis de distinguer deux groupes dont la principale différence provient de la production ou non de cellulose.
Les souches du premier groupe ne produisent pas de cellulose et présentent des taux de biofilms très faibles. L'introduction de SGI1 dans le génome de ces souches entrainent soit une diminution de production de biofilm, soit n'entraine aucun effet.
Les souches du deuxième groupe, productrices de cellulose, présentent des taux de production de biofilm beaucoup plus importants. La présence de SGI1 entraine soit une augmentation de production de cellulose et de biofilm, soit, pour le couple *S*.Schwarzengrund/ *S*.Schwarzengrund +SGI1, n'entraine pas d'effet.

L'étude réalisée au cours de cette thèse permet de nuancer les conclusions tirées par Malcova et al car SGI1 n'a pas systématiquement un effet positif sur la production de biofilm. Techniquement, il est indispensable d'effectuer une comparaison sur des souches isogèniques pour s'affranchir des variations potentiellement crées par le fond génétique des bactéries. Des souches prises aléatoirement dans l'environnement possèdent des fonds génétiques différents qui se traduisent par une production basale de biofilm différente, interdisant ainsi toute comparaison.
Néanmoins, l'étude réalisée a permis de mettre en évidence l'implication de SGI1 dans la production de cellulose, la production de biofilm ainsi que dans la motilité puisque des variations sont observées au sein des couples ou trio isogèniques ne différant que par la présence ou l'absence de SGI1. La modulation positive du taux de biofilm par SGI1 semble requérir un fond génétique particulier qui semble être en rapport avec la cellulose et le quorum sensing.

Ainsi, un ou plusieurs éléments génétiques de SGI1 sont impliqués dans les systèmes de régulation de ces trois phénomènes. Ces systèmes requièrent un grand nombre d'éléments qui interviennent à différents niveaux de chaines réactionnelles complexes. De nombreuses études restent à effectuer pour déterminer le ou les points de régulation modulés par SGI1. Notons cependant que la production de biofilm, de cellulose et la motilité font tous trois intervenir la signalisation cellulaire qu'est le quorum sensing, suggérant que SGI1 code potentiellement un élément impliqué dans cette signalisation.

Pour apporter des éléments de réponse, une analyse des différentes séquences protéiques de SGI1 avec le programme blastp (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) a permis de repérer deux ORFs, S007 et S044, qui présentent respectivement une homologie à 50 et 51 % avec la protéine diguanylate cyclase/phosphodiestérase impliquée dans la formation du c-di-GMP. Or le c-di-GMP est un messager secondaire possédant un rôle central dans la signalisation du Quorum sensing et dont le rôle dans la formation de cellulose a notamment été démontré (cf. V.5.2).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours des années se sont développées des souches résistantes aux antibiotiques et parfois responsables d'infections difficiles à maîtriser. Différentes études ont démontré que la sélection des souches résistantes était souvent consécutive à l'utilisation des antibiotiques dans les élevages intensifs d'animaux, et notamment lors de leur utilisation comme promoteurs de croissance. Toute administration d'antimicrobiens augmente ainsi le risque de voir émerger et se propager une résistance chez les bactéries.

Plus particulièrement, les dernières années ont vu une augmentation spectaculaire, en incidence et en gravité, des cas de salmonellose humaines dont l'origine est majoritairement liée aux sérotypes *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium. À la fin des années 1980, la prévalence des souches résistantes aux antibiotiques allait connaître un essor considérable avec l'émergence et la dissémination internationale rapide des souches *S.* Typhimurium DT104 multirésistantes aux antibiotiques. Ces souches ont représenté une préoccupation importante en raison de leur fort succès épidémique associé à des échecs thérapeutiques importants liés à leurs phénotypes de résistances.

La lutte contre l'émergence des résistances bactériennes aux antibiotiques nécessite une compréhension des mécanismes d'antibiorésistance ainsi que des phénomènes moléculaires impliqués dans la dissémination des gènes correspondants. En outre, des données spatio-temporelles sur l'évolution des résistances aux antibiotiques sont requises pour une mise en œuvre efficace de la politique d'utilisation des antibiotiques.

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté ci-dessus a été centré sur l'enjeu sanitaire majeur représenté par cette diffusion épidémique du clone *Salmonella* Typhimurium au cours des années 1990 chez l'homme et les bovins. Près de vingt années après, il apparaissait en premier lieu à la fois important d'actualiser les données bovines en France sur ce serovar, tant d'un point de vue de sa prévalence que d'un point de vue moléculaire, mais également d'évaluer la réalité ou l'ampleur de la diffusion de SGI1 dans le monde bactérien en général, à l'instar de la situation observée au sein du strict genre *Salmonella*, eu égard aux nombreux serovars hébergeant cet ilôt.

Au cours de la thèse, un bilan a donc été dressé sur la multirésistance aux antibiotiques chez les souches *Salmonella* Typhimurium isolées de bovins malades en France de 2002 à 2007.

Un premier constat a relevé de l'homogénéité majeure des déterminants de la multirésistance chez *Salmonella* Typhimurium isolées d'infections bovines en France, l'essentiel étant sous-tendu par la structure « originelle » de cet ilôt, caractérisée par la penta-résistance classiquement observée dans les années 1990. Ce faible pouvoir évolutif semble en contradiction avec les capacités moléculaires majeures de recombinaison et de transfert démontrées pour SGI1, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

Ce constat pose également question au regard des nombreux autres déterminants génétiques mobiles présents chez *Salmonella*, en particulier de résistance aux céphalosporinases de dernière génération, et dont l'intégration à des structures mobiles complexes telles que SGI1, constituerait une option évolutive favorable pour les entérobactéries, fondée sur une multi-résistance de plus en plus riche. C'est en l'occurrence un tel scénario d'accrétion génique progressive qui constitue l'hypothèse la plus plausible pour la constitution de SGI1, qui inclut des gènes d'origines aussi variées que *floR* (origine aquatique) et *pse-1* (béta-lactamase d'environnement, initialement décrite chez *Pseudomonas*). Un tel état des lieux permet en revanche aux microbiologistes de garder un certain optimisme scientifique, en considérant qu'une structure génétique mobile de multi-résistance, quoique conférant d'indéniables avantages sélectifs, ne constitue pas nécessairement une spirale évolutive inexorable. Il conviendra néanmoins, dans les années futures, de conserver la vigilance nécessaire vis à vis du risque que la dissémination de plus en plus importante de gènes de résistance plasmidiques, en raison de la pression de sélection croissante liée à l'usage antibiotique, ne conduise à de nouvelles combinaisons génétiques encore plus complexes, incluant en particulier SGI1.

Lors de l'étude, une attention particulière a été également portée sur les résistances aux quinolones et aux céphalosporines de troisième génération (C3G) qui constituent actuellement le traitement de référence des salmonelloses invasives ou systémiques chez l'homme. D'autres antibiotiques appartenant à ces familles sont également utilisés en médecine vétérinaire. L'usage de ces deux classes d'antibiotiques a sans doute contribué à l'émergence des résistances bactériennes associées et à la dissémination des gènes correspondant chez les salmonelles non typhiques. En effet, en France, des résistances aux

C3G ont été rapportées sporadiquement chez des souches *Salmonella enterica* isolées de volailles [110, 111]. Les hauts niveaux de résistance aux fluoroquinolones restent peu fréquents chez *S. enterica* [112, 113], mais on observe une augmentation significative de l'incidence globale des résistances aux quinolones chez les souches *S. enterica* isolées d'humains et d'animaux destinés aux productions alimentaires [114, 115].

Les gènes impliqués dans les résistances aux C3G sont souvent retrouvés sur des éléments mobiles, et notamment sur des plasmides conjugatifs, qui semblent se propager rapidement chez les animaux, et plus particulièrement au sein des souches d'*E.coli* [116, 117]. L'intégron In104, possédant un fort potentiel de recombinaison, il existe une certaine probabilité que des recombinaisons génétiques puissent se produire entre la région MDR de SGI1 et les éléments mobiles supports des gènes de résistances aux C3G et aux fluoroquinolones. La surveillance réalisée au cours de la thèse n'a cependant pas permis de détecter de tels réarrangements génétiques et aucune des souches *Salmonella* Typhimurium étudiée ne possédait de résistance aux C3G ou aux fluoroquinolones.

Sur un plan plus prospectif, il pourrait être donc intéressant de poursuivre la stratégie de surveillance en miroir de ces enseignements, dans le but de documenter la réalité épidémiologique de la diffusion des gènes de résistance chez *Salmonella*, par comparaison avec le fort pouvoir de diffusion que l'on pourrait attendre, en théorie, à partir de supports génétiques mobiles, mobilisables, et/ou recombinables. De même, la caractérisation de l'ilôt SGI1 au sein des salmonelles bovines devra tirer enseignement de ces données, et il devra donc être proposé d'en axer les objectifs autour d'enjeux élargis, soit à d'autres filières animales (et donc d'autres sérovars, le sérovar Typhimurium étant prédominant chez les bovins), soit à des évolutions moléculaires impliquant SGI1 et d'autres gènes de résistance. L'ensemble de ces études continuera de permettre la mise en regard, qui reste essentielle pour la maîtrise des risques sanitaires, des aptitudes de diffusion et de recombinaison fondées sur des propriétés moléculaires et la réalité de la diffusion des gènes au sein du genre *Salmonella* sur le terrain.

En revanche, notre travail a permis de décrire un nouveau variant de l'ilôt SGI1, que nous avons dénommé SGI1-T. La description de ce variant constitue une information scientifique qui étend la description des remaniements génétiques survenus au sein de cet ilôt. Au-delà de l'aspect mécanistique fondamental, il semble néanmoins que ce résultat confirme

une évolutivité plutôt restreinte de SGI1 sur un plan plus global au sein de la population des salmonelles, et ce malgré les réserves qu'il convient à l'évidence de porter sur les limites de tout échantillonnage. Là encore, cette évolutivité de SGI1 méritera d'être suivie au cours des années, en n'excluant pas qu'en fonction des usages croissants d'antibiotiques, de tels réarrangements moléculaires puissent parfois se faire avec des fréquences plus importantes.

Dans un cadre encore élargi de la problématique de dissémination de l'ilôt SGI1, le travail de thèse a également envisagé la diffusion inter-espèce de cet élément, dont l'hypothèse était fondée sur la démonstration récemment publiée de son aptitude à être mobilisé *in vitro*. Pour autant, le criblage de la collection de souches de l'AFSSA Lyon n'a pas permis de détecter l'ilot génomique SGI1 chez d'autres genres bactériens que *Salmonella* suggérant une mobilité très modérée de SGI1 en conditions de terrain. Ceci peut être expliqué par l'absence, sur SGI1, de gènes codant les fonctions nécessaires au transfert conjugatif qui implique la présence obligatoire d'un élément mobile conjugatif additionnel au sein de la cellule pour que le transfert de SGI1 puisse être possible. En outre, SGI1 étant un élément mobilisable intégratif (IME), son intégration dans un génome bactérien nécessite une recombinaison au niveau du site spécifique *attB* qui n'est pas forcément retrouvé chez toutes les espèces bactériennes.

Nos résultats sont également en cohérence avec ceux d'un projet européen récemment achevé (MedVetNet, WP21), dont l'objectif était d'évaluer la présence de SGI1 chez des souches d'*E.coli* collectées dans de nombreux pays européens à partir de souches animales. Dans le cadre de ce projet de grande ampleur, aucune souche étudiée ne s'est révélée héberger SGI1. L'ensemble de ces données donne un éclairage intéressant sur la nécessité fondamentale de confronter en permanence les données de laboratoire et les données de terrain pour mieux comprendre la dissémination animale et environnementale de la résistance. Dans le cas présent, les éléments de mobilisation obtenus *in vitro* ont permis de fournir une crédibilité mécanistique à une dissémination possible de l'ilôt SGI1 au sein des entérobactéries. Les données de terrain, quant à elles, semblent relativiser l'impact de ce mécanisme dans l'épidémiologie de SGI1 chez les souches naturelles. Il reste que ces résultats relèvent d'études très récentes, encore peu nombreuses, et s'adressant à une espèce bactérienne (*Escherichia coli*) parmi la plus répandue qui soit. Il reste donc tout à fait plausible que l'échantillonnage des souches d'*E.coli* n'ait pas encore permis d'accéder à la sous-population hébergeant SGI1.

En revanche, la recherche de cet élément chez le genre *Pasteurella* au travers du crible de la résistance phénotypique au florfénicol, antibiotique parmi les plus conservés au sein de SGI1, nous a conduits à la première description d'une souche de pasteurelle (*Pasteurella trehalosi*) possédant le gène *floR*. Ce résultat singulier souligne toute la complexité de la diffusion des déterminants génétiques de résistance entre espèces bactériennes, et l'esprit nécessairement ouvert que l'on doit avoir dans toute conduite d'action de surveillance.

En effet, le florfénicol a été introduit en 1996, en remplacement du chloramphénicol toxique, pour le traitement des infections respiratoires bovines, sans qu'aucune résistance à cet antibiotique ne soit apparue en dix années d'utilisation dans cette espèce bactérienne, pourtant cible de l'antibiotique. En revanche, et de façon étonnante, le gène *floR* est actuellement très répandu chez les souches d'*E.coli* issues de diarrhées néo-natales, et donc très essentiellement non concernées par une pression antibiotique par le florfénicol. La principale hypothèse d'explication de l'absence de résistance au florfénicol décrite jusqu'à ce jour chez les pasteurelles porte sans doute sur la nature des structures plasmidiques porteuses de ce gène, qui doivent concilier leur capacité de maintien au sein d'une espèce bactérienne donnée et leur pouvoir de dissémination entre espèces bactériennes. En l'espèce, le plasmide porteur du gène *floR* semblerait facilement se maintenir chez *E. coli*, et non chez *Pasteurella*.

De façon plus globale, le laboratoire s'est récemment doté des outils de caractérisation moléculaire nécessaires au typage plasmidique, qui pourra permettre, dans ce cas précis, et dans la suite de notre travail, de mieux connaître les supports mobiles du gène *floR*, et donc d'adresser plus finement la question de sa mobilité entre bactéries, qu'elle implique, ou non, l'ilôt SGI1.

Le rôle de SGI1 dans la formation de biofilms a également constitué une deuxième approche envisagée dans ce travail de thèse dans le but de couvrir, sous une forme actualisée, les principales fonctions mises en avant pour cet ilôt génomique jusqu'à ce jour.

Les principales données sur ce rôle possible de SGI1 reposaient principalement sur les travaux de Malcova *et al*, qui ont comparé deux populations de souches de salmonelles,

possédant ou non SGI1, mais également différentes entre elles par leurs sérotypes et leurs fonds génétiques. Cette comparaison, qui conclut à une formation de biofilms supérieure chez les souches possédant SGI1, ne s'appuyait ainsi que sur une analyse statistique entre ces deux populations, ce qui nous a semblé constituer un élément d'hypothèse suffisamment intéressant, mais également possiblement fragile, pour envisager cette question au plan expérimental.

Un panel de 6 couples isogéniques possédant ou non SGI1 a ainsi été évalué pour la formation de biofilms, incluant plusieurs couples de souches de *Salmonella*, principalement de serovar Typhimurium mais également Enteritidis. Au-delà de la variabilité observée entre couples de souches, les résultats continuent d'être en faveur d'un rôle de SGI1 dans la formation de biofilms, et donc de façon plus globale dans un rôle non limité à la résistance aux antibiotiques. Ces éléments sont donc de nature à renforcer l'hypothèse que les souches de salmonelles épidémiques porteuses de l'ilôt SGI1 puissent avoir bénéficié, en plus de leur capacité de résistance antimicrobienne, de propriétés complémentaires leur conférant un avantage sélectif supérieur, tel qu'une meilleure aptitude à la colonisation par formation de biofilm.

A ce jour, les mécanismes moléculaires possiblement impliqués mettant en relation la présence de SGI1 et une formation accrue de biofilm sont totalement inconnus et pourraient faire l'objet d'une étude approfondie. Dans ce but, il pourrait être choisi un panel de souches avec et sans SGI1 parmi les couples montrant un différentiel important dans la formation de biofilms. En effet, certains résultats de notre étude suggèrent, par exemple, que la production de cellulose peut être très largement variable d'une souche de *Salmonella* à l'autre, voire éventuellement d'un serovar à l'autre, possiblement en relation avec l'intégrité du LPS. Il s'agirait donc d'investiguer en premier lieu ces niveaux d'intégrité du LPS chez les souches étudiées.

Egalement, l'étude du rôle de SGI1 dans la formation de biofilm a permis l'obtention de résultats qui semblent plus généralement confirmer l'implication de SGI1 dans la signalisation cellulaire du Quorum Sensing. En effet, une régulation positive de SGI1 sur la production de biofilm associée à la production de cellulose a été notée pour un groupe restreint de souches suggérant d'une part, la présence sur SGI1 d'éléments génétiques impliqués dans le développement de biofilm, et, d'autre part, la présence obligatoire d'un fond génétique particulier pour la mise en place de ces phénomènes de régulation. La

signalisation cellulaire impliquée dans la formation de biofilm est très complexe car elle met en jeu de nombreux éléments génétiques qui peuvent interférer les uns avec les autres Ainsi, la place de SGI1 au sein de cette signalisation semble difficile à déterminer et nécessitera également des études additionnelles qui peuvent aussi constituer des perspectives à notre travail. Néanmoins, l'analyse BLAST des séquences protéiques putatives de SGI1 a permis de détecter deux ORFs (S007 et S044) potentiellement impliqués dans la formation du c-di-GMP, un élément majeur du Quorum Sensing qui constitue une piste à explorer.

Enfin, un résultat important de notre travail a consisté en la première mise en évidence du rôle positif de SGI1 dans la formation de biofilm chez une autre espèce bactérienne que *Salmonella*. En effet, de façon surprenante, l'augmentation la plus importante dans la formation de biofilm en présence de SGI1 a été observée chez une souche d'*Escherichia coli* complémentée. Ce résultat, qui apparaît donc en faveur de ce rôle positif de SGI1 de façon relativement indépendante du fond génétique de la bactérie, crédibilise davantage encore l'hypothèse testée. En outre, il adresse la question de l'avantage sélectif que pourrait conférer SGI1 des populations naturelles d'*E.coli* si cet ilôt était en mesure de s'y disséminer largement. A ce jour, la présence de SGI1 chez *E. coli* n'a encore jamais été décrite. En revanche, sa mobilisation expérimentale à partir d'une souche de *Salmonella* l'a été. Il conviendra donc à l'avenir de déterminer si de telles souches sont présentes à l'état naturel, et dans ce cas, il pourra être opportun de caractériser leurs capacités à produire un biofilm et de les mettre en relation avec leurs niveaux de pathogénicité/colonisation chez l'animal qui les aura hébergées.

Enfin, les travaux réalisés au cours de la thèse ont également porté sur l'évaluation d'un éventuel potentiel de virulence conféré par SGI1.

Ce rôle de SGI1 dans une virulence accrue des souches qui l'hébergent repose sur peu de données moléculaires, sinon sur les études d'homologies avec des gènes de virulence qui ont pu être déduites par alignement de séquences sur la partie de SGI1 extérieure à l'ilôt de mulitrésistance. Ce rôle a été également évoqué en raison d'une virulence apparemment supérieure de ces souches chez l'homme, à qui ont été attribués des taux de mortalité supérieurs à ceux associés aux infections à salmonelles non porteuses de SGI1.

Une stratégie de modélisation expérimentale de ce pouvoir virulent éventuellement accru a ainsi été mise en œuvre, qui reposait sur la comparaison du pouvoir virulent *in vivo* de souches isogéniques ne se distinguant que par la présence ou l'absence de SGI1. Cette étude en modèle murin de salmonellose systémique n'a pu être totalement finalisée à ce jour, et les résultats intermédiaires obtenus ont été décrits en détail dans la partie Résultats du manuscrit.

Un premier élément de discussion porte sur l'importance de l'intégrité du LPS pour l'analyse de la virulence comparée des souches étudiées. Ce point a également été mis en évidence lors de l'étude de la production de biofilms, et ces deux approches montrent finalement avec cohérence que la caractérisation fine du LPS pourrait constituer l'un des axes majeurs de recherche en suite de notre travail, et préalable aux expérimentations animales.

Egalement, l'îlôt génomique SGI1 comprend de nombreuses séquences codantes qui ne présentent pas d'homologies avec des gènes connus. Il apparait donc nécessaire de poursuivre et compléter notre étude dans une approche plus segmentée des fonctions codées par SGI1. En particulier, il serait pertinent de construire des souches uniquement délétées de certaines séquences codantes au sein de SGI1, puis d'en évaluer le rôle en modèle murin.

MATERIELS ET METHODES

XIII. Techniques générales de microbiologie et de biologie moléculaire.

XIII.1 Typage des salmonelles

Le sérotypage, basé sur la caractérisation des antigènes somatiques O et flagellaires H1 et H2, a été réalisé par tests d'agglutination avec des sérums spécifiques (Bio-rad, Marnes-la-Coquette), selon le schéma de White-Kaufmann-Le Minor [118].
Les lysotypes des isolats de sérotype Typhimurium, ont été déterminés par l'Institut Pasteur, Bruxelles, Belgique selon Threlfall and Frost, 1990.

XIII.2 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.

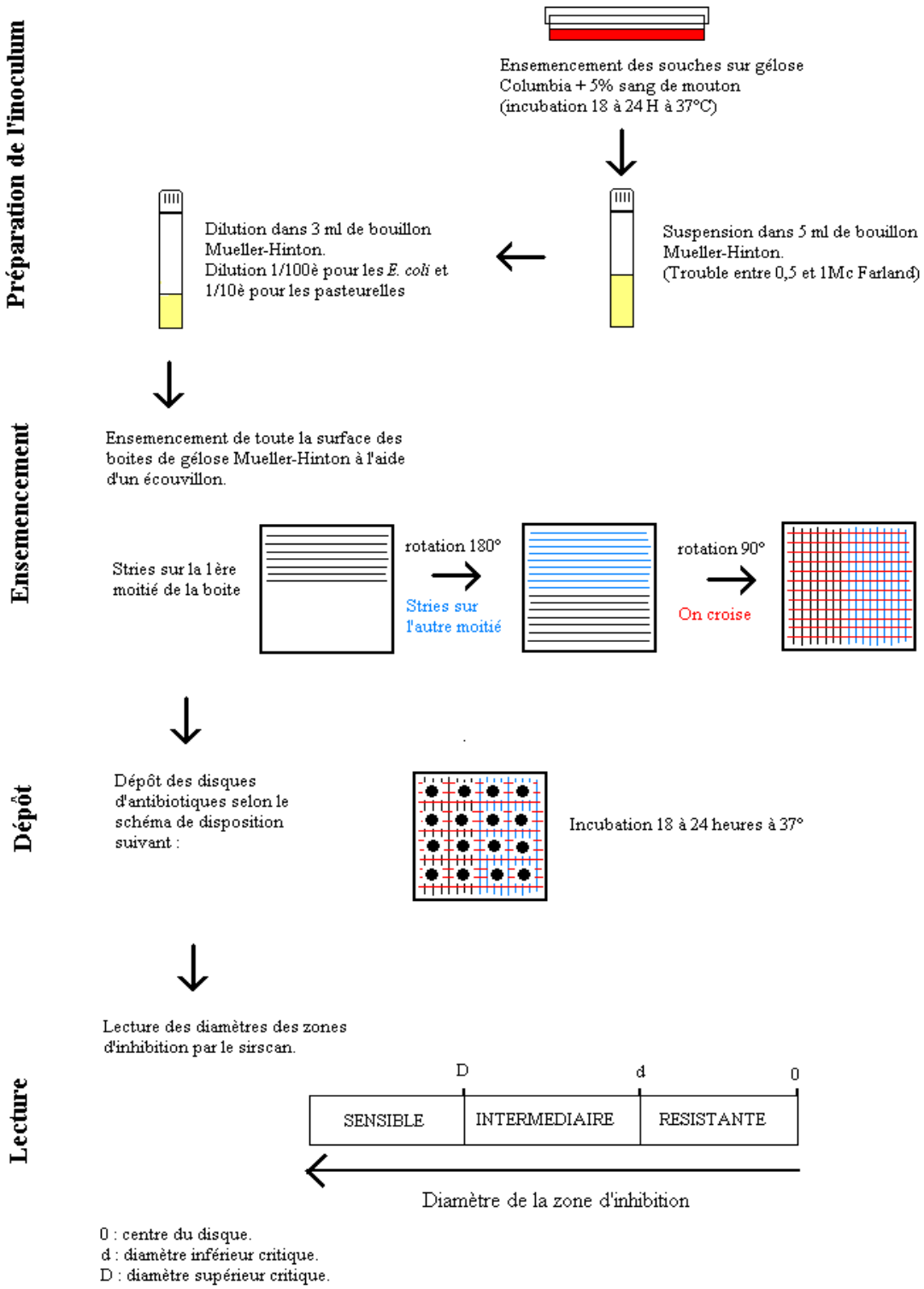
XIII.2.1 Méthode de diffusion en milieu gélosé.

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette méthode est aussi appelée « antibiogramme standard ».
Elle consiste à ensemencer les différentes souches à tester sur des boites de géloses Mueller-Hinton à la surface desquelles des disques de papier filtre contenant des concentrations connues d'antibiotiques sont déposés. Les antibiotiques diffusent, créant un gradient de concentration croissant autour du disque. Lorsque la concentration est supérieure à la CMI (concentration minimale inhibitrice) de la bactérie ensemencée, la croissance bactérienne s'arrête.
Après une incubation à 37°C sur la nuit, on pourra observer des zones d'inhibition de croissance autour des disques qui seront fonction de la sensibilité des souches à l'antibiotique déposé. La lecture des diamètres des zones d'inhibition se fait par un système expert (**SIRSCAN**, I_2A).

Des normes de standardisation, garantissant la fiabilité des résultats obtenus, sont à respecter. **La standardisation** est régie par des documents émanant de l'O.M.S et des divers comités nationaux (pour la France, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, www.sfm.asso.fr). Elle prend en compte de nombreux facteurs dont la composition du milieu, la densité de l'inoculum bactérien, l'épaisseur de la gélose, les disques

antibiotiques, la durée et la température d'incubation mais également l'utilisation parallèle de souches de références aux profils d'antibiorésistance connus.

Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé.



0 : centre du disque.
d : diamètre inférieur critique.
D : diamètre supérieur critique.

Pour l'étude réalisée ici, les disques antibiotiques suivant ont été utilisés : amoxicilline (25 µg), l'amoxicilline-acide clavulanique (20-10 µg), chloramphénicol (30 µg), florfenicol (30µg), streptomycine (10 UI), sulfamides (300 µg), tétracycline (30 UI), triméthoprime (5 µg), kanamycine (30 UI), gentamicine (15 µg), apramycine (15 µg), acide nalidixique (30 µg) et enrofloxacine (5 µg).

La souche ***Escherichia coli*** **ATCC 25922** est systématiquement utilisée comme témoin.

XIII.2.2 E-test.

La mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée par E-Test®. (AES Chemunex, Bruz, France)

Une suspension bactérienne de la souche à étudier est réalisée dans 5 ml de bouillon Mueller-Hinton et standardisée à 1 Mc Farland. Après ensemencement de cette suspension sur des boites de gélose Mueller-Hinton, les bandelettes E-tests sont déposées à la surface de la gélose. Une concentration croissante d'antibiotique est alors diffusée le long de la bandelette.

Après incubation des boites pendant la nuit à 37°C, la lecture de la concentration minimale inhibitrice est effectuée.

La CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la bandelette avec le tapis bactérien.

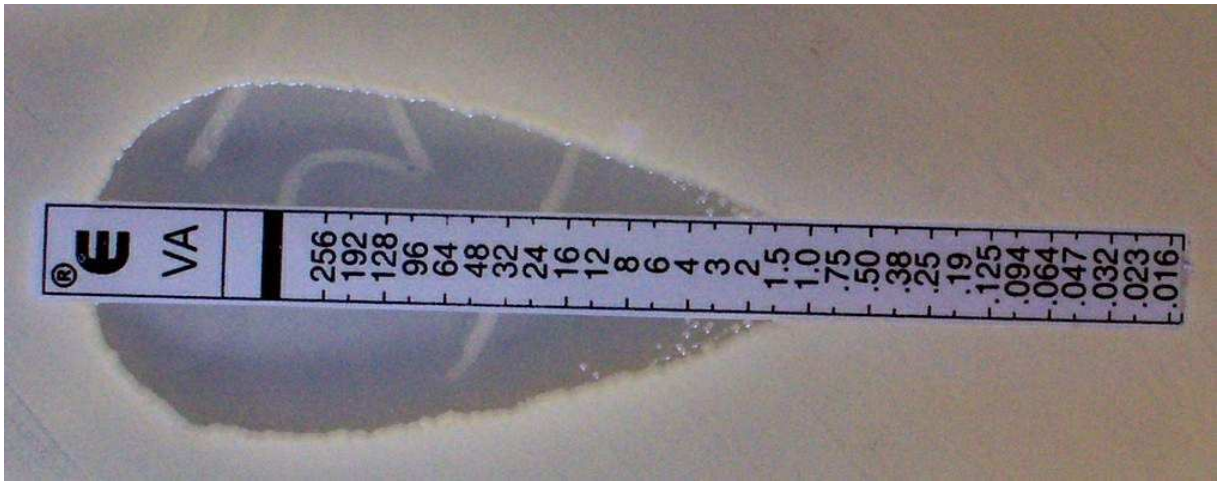


Figure 72 : Exemple de résultats de mesure de CMI avec un E-Test®. Valeur obtenue : 1.5 µg/ml .

XIII.3 Extraction d'ADN.

XIII.3.1 Extraction des ADN totaux.

Les ADN totaux sont extraits et purifiés avec le kit QIAmpDNA Minikit (QIAGEN) à partir d'une suspension bactérienne effectuée dans 5 ml de bouillon cœur cervelle mise à incuber à 37°C pendant la nuit. Après lyse des bactéries, l'ADN est précipité et purifié sur une micro-colonne QIAGEN constituée de gel de silice.

XIII.3.2.Extraction des ADN plasmidiques.

XIII.3.2.1 Par kit QIAGEN.

Les ADNs plasmidiques sont extraits avec le kit QIAmp DNA miniprep à partir d'une suspension bactérienne effectuée dans 5 ml de bouillon cœur cervelle (BHI) mise à incuber à 37°C pendant la nuit. Après lyse bactérienne et lyse alcaline de l'ADN, les acides nucléiques de faibles poids moléculaires (plasmides) sont renaturés par addition d'acide faible. Ils sont alors purifiés sur une colonne QIAGEN constituée d'une résine échangeuse d'ions. L'ADN est, au final, récupéré par précipitation à l'isopropanol.

XIII.3.2.2 Par lyse alcaline.

Les ADNs plasmidiques sont extraits selon le principe de lyse alcaline à partir d'une suspension bactérienne effectuée dans 10 ml de bouillon cœur cervelle mise à incuber à 37°C pendant la nuit. Après lyse bactérienne et lyse alcaline de l'ADN, les acides nucléiques de faibles poids moléculaires (plasmide) sont renaturés par addition d'acide faible. Ils sont alors purifiés par extraction liquide-liquide en utilisant le phénol et le chloroforme. Ils sont ensuite récupérés par précipitation à l'éthanol absolu.

XIII.4 Polymerase Chain Reaction.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur iCycler de Biorad avec 200 µM de desoxynucléotide triphosphate, 2.5 mM de $MgCl_2$, 2.5 U de Taq Polymérase et des concentrations variables d'amorces selon la PCR réalisée.

La souche ***Salmonella enterica*** **sérotype Typhimurium BN9181**, comportant la structure classique de l'ilot génomique SGI1, est utilisée comme témoin positif pour les PCRs ciblant les gènes portés par SGI1 [43].

Les différentes amorces utilisées sont résumées dans le tableau 10 suivant.

PCR n°	Nom de l'amorce	Gène ciblé.	Séquence nucléotidique (5'-3')	Position dans SGI1*
1, 38	U7-L12	*thdf*	ACACCTTGAGCAGGGCAAAG	1
1,4	LJ-R1	*int*	AGTTCTAAAGGTTCGTAGTCG	500
2, 3, 5	104-RJ	S044	TGACGAGCTGAAGCGAATTG	42373
2	104D	*yidY*	ACCAGGGCAAAACTACACAG	47130
3, 41	C9-L2	*int2*	AGCAAGTGTGCGTAATTTGG	42887
4	EcU7-L12	*thdf*	ACATCTACAACAGGGCAAAG	
5	Ec104D		AACCATTTTGAGGTCACACA	
6	FwsodB	*sodB*	GAAAAATCTCGCCGCATAAG	
6	RvintSGI1	*int*	CCTCACCTTCAACAACTCCG	
7	FwS044	S044	CTACCCAGGAGCCACAATCA	
7	RvpurR	*purR*	GCCCGTTTCGCTACATCTTT	
8,12	SGI1-int-F	*int*	CAGAGCCGCACTAAATGAAGCGTT	393
8	SGI1-int-R	*int*	AAGCTGGGCCACAGCAAATGTATG	1565
9	SGI1-S044-F	S044	AAACCGTCCCTAACCTTTGTCCCT	
9	SGI1-S044-R	S044	TTGAGCTGTTCAGCCCTGCAATTC	
10	circ1		AGCAAAATCGTGAGAAGGGA	
10	circ2		TGATGAGACACCTGACGAGC	
11	xis-Fw	*xis*	CCTTGAATGCCTTGAGAAGC	1927
11	xis-Rv	*xis*	GTCGCCGGGTAACAGCAATG	1472
12	RvS004	S004	CCAAATAGGGCACTTCCAGA	3561
13,14	FwtraN	*traN*	GAGAGAGTGGCGAGTTGAAA	3969
13	RvtraN	*traN*	GTGATGCTGATGCTATGGAT	6034
15	FwS006	S006	CATAGGAGCGAGGCAACAAA	6335
15	RvS008	S008	CGCCTTTTTCATTTACGCCT	8035
16	FwtraG	*traG*	CTTTCAATAATCGCAGCCAT	8673
16	RvtraG1	*traG*	CTTTCAATAATCGCAGCCAT	11784
14	RvtraG2	*traG*	ATGGCTGCGATTATTGAAAG	8692
17	5'CS	cassette	TTTGTACAGTCTATGCCTCGGG	27871
17	3'CS	cassette	GACCTGATAGTTTGGCTGTGAGCA	28867
18	int1	*int1*	GCTCTCGGGTAACATCAAGG	27304
18	aadA2	*aadA2*	GACCTACCAAGGCAACGCTA	28439
19	sulter	*sul1Δ*	AAGGATTTCCTGACCCTG	29604
19	F3	*floR*	AAAGGAGCCATCAGCAGCAG	30546
20	F4	*floR*	TTCCTCACCTTCATCCTACC	31397
20	F6	*tetR*	TTGGAACAGACGGCATGG	31995
21, 28	tetR	*tetR*	GCCGTCCCGATAAGAGAGCA	32242
21	tetA	*tetG*	GAAGTTGCGAATGGTCTGCG	33801
22, 29	in2	*groEL/int 1*	TTCTGGTCTTCGTTGATGCC	36802
22	pse1	*pse1*	CATCATTTCGCTCTGCCATT	38121
23	S026-FW	S026	TCGGGTAATCTCAGCAGAGC	25021
23	int-RV	*int1*	GGGCATGGTGGCTGAAGGACC	27266
24	DB-T1	*IS*6100	TGCCACGCTCAATACCGAC	41120
24	MDR-B	S044	GAATCCGACAGCCAACGTTCC	41905
25, 27	orf1-F	*orf1*	TCGCTGTCGCCGAATATCTCA	33920

PCR n°	Nom de l'amorce	Gène ciblé.	Séquence nucléotidique (5'-3')	Position dans SGI1*
26	orf2-F	*orf2*	TACCCGGACTTCATTGCACGG	35110
26, 27	orf2-R	*orf2*	TGAAATCCACCGGATCCCATT	36095
29	IS6100Rv2	*IS*6100	AATGGTGGTTGAGCATGCC	41475
30	F1764	*floR*	CCTTTGTCGCTTTCCG	
30	F1765	*floR*	ACCCACATCGGTAGGA	
31	CmlA	*cmlA*	TCTTTCTGGGGCTTCGGATT	
31	CmlB	*cmlA*	GCCACATTGGAGCAATAAAG	
32	cat1	*catAIII*	ACCATGTGGTTTTAGCTTAACA	
32	cat2	*catAIII*	GCAATAACAGTCTATCCCCTTC	
33	sul1	*sul2*	ACAGTTTCTCCGATGGAGGCC	
33	sul2	*sul2*	CTCGTGTGTGCGGATGAAGTC	
34	Int1	*int1*	GCTCTCGGGTAACATCAAGG	
34	aaCR	*aacR*	GCGGGCACTTTTTCACTCAT	
35, 36	AmpF	*bla*	ATACGGGATAATACCGCGCCACAT	
35, 37	AmpR	*bla*	GTCAACCGCAGCCAACGCAATAAA	
36	intR	*aac(3)-Id*	GTCAACCGCAGCCAACGCAATAAA	
37	intF	*aac(3)-Id*	TTTGCAACTCATACGCGGCGA	
38, 39, 40	kt	*kan*	CGGCCACAGTCGATGAATCC	
41, 39, 42	k2	*kan*	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	
43, 40	P1	FRT	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
43, 42	P2	FRT	CATATGAATATCCTCCTTAG	

*Les positions des amorces sont données selon la séquence complète de SGI1 déposée à Genbank sous l'accession n°AF261825.

Tableau 10 : Description des différentes amorces utilisées pour les réactions PCR.

XIII.5 Hybridation ADN-ADN : Southern blot.

❖ Digestion de l'ADN.

Les ADN totaux, extraits avec le kit QIAmp DNA Minikit de Qiagen, sont digérés avec les enzymes de restriction appropriés à une concentration finale de 1U/µl.

Les digestions sont réalisées pendant la nuit à 37°C dans un volume final de 35µl contenant le tampon correspondant à l'enzyme utilisé et la RNAase à 14 pg/µl.

❖ Migration des ADN.

Les différents fragments de digestion sont séparés selon leurs tailles par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8 % contenant du bromure d'ethidium. On déposera 5µl de marqueurs de poids moléculaires (Smart Ladder), 30 µl d'ADN plasmidique et 30µl d'ADN chromosomique. La migration se fait pendant la nuit à 24V.

❖ Transfert des ADN.

Les ADN présents sur le gel sont alors dénaturés puis transférés sur une membrane de nylon à l'aide d'un **vacuum blotter**.

Le gel est déposé sur une membrane de nylon, elle-même fixée sur un système relié à une pompe à vide. Le transfert est réalisé à une pression de 50 mbar.

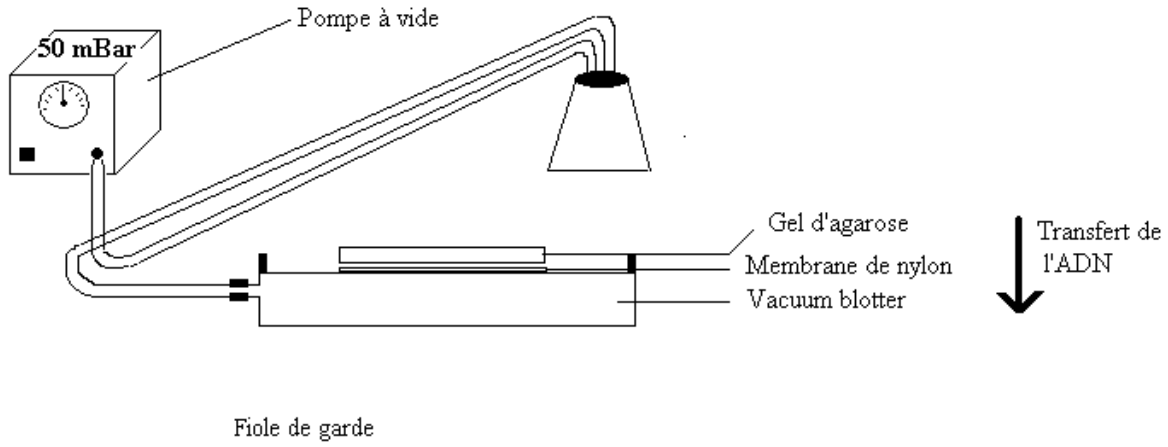


Figure 73 : système de transfert d'ADN pour le Southern Blot.

Le gel est tout d'abord recouvert de tampon de dépurination (HCl 0,25M) pendant 15 minutes pour faciliter le transfert des fragments de haut poids moléculaires. Il est ensuite recouvert de tampon de dénaturation (NaOH 0,5M ; NaCl 1,5M) pendant 15 minutes pour rendre l'ADN monobrin. La soude est ensuite neutralisée par addition d'une solution de neutralisation (Tris 1M ; NaCl 1,5M, pH=7,4) pendant 15 minutes. Le gel est enfin recouvert d'un tampon de transfert (20× SSC) pendant une heure. Un courant liquidien descendant créé par la pompe va alors permettre le déplacement de l'ADN du gel vers la membrane.

Après le transfert, les fragments d'ADN monobrins sont fixés de manière irréversible sur la membrane par irradiation aux UV.

❖ Préparation de la sonde.

La préparation de la sonde se fait par le kit DIG-High Prime DNA Labelling and Starter kit de Roche.

Il consiste à marquer l'ADN sonde avec la **digoxigenine**, un haptène extrait d'une plante appelée *Digitalis lanata*. Le marquage se fait par l'incorporation de DIG dUTP (UTP couplé à la digoxigénine en position 5' via un bras espaceur de onze carbones) à la place de l'UTP.

❖ Hybridation ADN-ADN.

La membrane sur laquelle les ADN monocaténaires ont été fixés est mise à incuber dans un tampon de pré-hybridation (DIG Easy Hyb préchauffé à 42°C) pendant trente minutes à 42°C. La membrane est ainsi mise dans des conditions de pH, de salinité et de température adéquates pour l'hybridation. Après trente minutes, le tampon de pré-hybridation est remplacé par le tampon d'hybridation (DIG Easy Hyb préchauffé à 42°C auquel on a préalablement ajouté 25ng de sonde marquée monobrin). La membrane est alors mise à incuber dans un four à hybridation à 42°C pendant la nuit.

❖ Révélation.

La révélation se fait selon kit DIG-High Prime DNA Labelling and Starter kit de Roche par **révélation immunochimique** via un anticorps conjugué à la phosphatase alcaline. Un anticorps, l'antidixoxigenine, se fixe sur les molécules de digoxigenine présentes sur les dUTP des ADN sondes. Cet anticorps est couplé à la phosphatase alcaline, une enzyme dont la réaction conduit à la formation d'un précipité coloré après addition d'un substrat chromogénique, le NBT/BCIP.

Dans le cadre des études réalisées, deux Southern blot utilisant les sondes p1-9 et pSTF3 ont été réalisées (cf. tableau 11)

Sonde	Séquence ciblée	Enzyme de restriction	Fragments attendus
P1-9	ORFs S023 à S024 de SGI1	*Xba*I	4 et 9 kb
pSTF3	Séquence complète de l'intégron In104 de SGI1	*Hind*III	2, 2.4et 9.3 kb
		*Xba*I et *Xho*I	6, 4.3, 3.9 et 1.8 kb.

Tableau 11 : Sondes utilisées pour la caractérisation moléculaire de l'îlot génomique SGI1.

XIII.6 Expériences de conjugaison.

Les deux souches à conjuguer sont repiquées dans 5 ml de BHI et incubées à 37°C. Le soir, une goutte de la première suspension est additionnée à 10 ml de bouillons BHI (bouillons 1) qui sont alors incubés la nuit à 37°C sous agitation.

Le lendemain, quatre gouttes sont repiquées dans 10 ml de bouillons BHI (bouillons 2) qui sont incubés 5 h30 à 37°C. Cette étape correspond à la formation des pili.

Dans un tube stérile, nous mettons en contact 1 ml du bouillon 2 de la souche donatrice avec 3 ml du bouillon 2 de la souche réceptrice. Ce mélange est incubé pendant la nuit à 37°C sans agitation.
Après incubation, des boites de géloses, additionnées des marqueurs antibiotiques adéquats, sont inoculées en stries avec ce mélange et incubées la nuit à 37°C. Les colonies obtenues sont récupérées et conservées pour des analyses ultérieures.

XIII.7 Electrophorèse en champs pulsés.

Le principe de l'électrophorèse en champs pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN augmentant ainsi la probabilité qu'elle puisse traverser les mailles du gel. L'électrophorèse en champs pulsés permet ainsi la séparation de fragments d'ADN de tailles importantes allant de 1 kb à une dizaine de mégabases.
L'analyse en PFGE est une méthode hautement discriminatoire qui permet d'établir des empreintes génétiques d'isolats bactériens.
Les suspensions bactériennes sont piégées dans de l'agarose Clean Cut 2% (Bio-rad) puis aliquotées dans des matrices en plastique. Une fois refroidis, les aliquots, appelés « plugs », sont immergés dans un tampon de lyse (tampon TEE, 1 mg/ml protéinase K, 1% N-Lauroyl-Sarcosine) qui permet la lyse cellulaire et la libération de l'ADN. S'ensuit une série de lavages qui permet la purification de l'ADN. L'ADN purifié est ensuite digéré par l'enzyme adéquate et soumis à une électrophorèse en champs pulsés réalisée avec le système CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, CA). L'électrophorèse est réalisée à 6V/cm à 14°C pendant 24h avec des temps de changement de champs électrique allant de 10 à 60 secondes.

Les profils de restriction PFGE obtenus ont été analysés avec le logiciel BioNumerics 4.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgium). Il permet la normalisation de l'image ainsi qu'un classement des différents profils dans des groupes à l'aide du coefficient de DICE et de la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Averages, Méthode des moyennes de paires non ajustées).

L'ADN de la souche ***Salmonella enterica*** **sérotype Braenderup H9812** digéré par *Xba*I est utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

XIII.8 Préparation de cellules compétentes et transformation.

XIII.8.1Préparation de cellules compétentes.

Les bactéries sont rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium, qui a un effet perméabilisant sur la membrane et permet l'incorporation d'ADN exogène par la bactérie.

La technique décrite est dérivée de la méthode de traitement au CaCl2 (Inoue, H. *et al.* 1990).

20 ml de bouillon LB sont inoculés avec 0,2 ml d'une culture de la nuit et incubés à 37°C sous agitation. Quand la DO à 600nm atteint 0,6, la culture est refroidie sur la glace pendant 30 minutes puis centrifugée à 5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 20 ml de $CaCl_2$ (100 mM) et refroidi 20 à 30 minutes dans la glace. La suspension obtenue est de nouveau centrifugée à 5000 rpm pendant 15 min à 4°C et resuspendue dans 1 ml de $CaCl_2$ (100 mM) additionné de 20% de glycérol. Les cellules compétentes obtenues sont aliquotées par volume de 100 µl er congelée à -80°C.

XIII.8.2 Transformation par choc thermique.

L'ADN à transformer (pas plus de 50 ng dans un volume de 10 µl maximum) est mélangé à 100 µl de bactéries compétentes. Le tube est refroidi 30 minutes dans la glace puis transféré rapidement dans un bain marie préchauffé à 42°C. Après une incubation d'une minute, le tube est remis dans la glace dans laquelle on le laissera incuber une minute également. 400µl de bouillon SOC préchauffé à 37°C sont alors ajoutés et la culture est incubée une heure dans un bain marie réglé à 37°C pour permettre aux bactéries d'exprimer le marqueur de résistance antibiotique.

Des volumes variables de culture sont ensuite étalés sur des boites de géloses LB contenant l'antibiotique adéquat pour permettre la sélection des bactéries transformées. Après incubation la nuit à 37°C, les colonies qui ont poussé sont récupérées et conservées pour des analyses ultérieures.

XIII.8.3 Transformation par électroporation.

L'ADN à transformer est additionné à 40 ou 50 µl de bactéries compétentes froides. Le mélange est laissé dans la glace pendant une minute puis transféré dans une cuvette

d'électroporation 0,1 mm refroidie. L'électroporation est réalisée avec un gene pulser (Biorad) sous les conditions recommandées par le fabricant (25µF, 200Ω, 1,25 kV). Les cellules sont ensuite reprises dans 1 ml de bouillon SOC et mises à incuber à la température adéquate pendant deux heures puis la nuit à température ambiante.

Après incubation, les cellules sont centrifugées à 5000 rpm pendant 15 min puis concentrées en enlevant 800 µL de surnageant. Le culot est homogénéisé avec les 200µl de surnageant restant et réparti sur 3 boites de gélose LB contenant l'antibiotique adéquat. Après incubation pendant la nuit, les colonies obtenues sont récupérées et conservées pour des analyses ultérieures.

XIII.9 Test calorimétrique CAT.

Le test calorimétrique CAT a été réalisé en Allemagne par « Institut für Tierzucht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft ».

Les souches bactériennes sont suspendues dans 0.2 ml de solution saline (NaCl 1 M, EDTA 0.01 M, SDS 0.05%, PH = 8) et incubées à 37°C pendant une heure. Après incubation, les solutions sont centrifugées et on additionne à chaque tube 0.2 ml d'une solution constituée de 2 parts de tris(hydroxymethyl)-aminomethane 0.2 M, de deux parts d'acetylcoenzyme A 5 mM et d'une part de 5,5'-di-thiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) minomethane 10 mM, dans 0.1 M de tris-hydroxymethyl)aminomethane.

0.2 ml de chloramphénicol stérile à 5 mM a été additionné à chaque tube. De manière analogue, 0.2 ml d'eau stérile a été additionné à un tube qui sert de témoin négatif.

Tous les tubes sont remis à incubés à 37°C pendant 5 minutes et la reaction produite a été évaluée par comparaison avec le tube témoin. Une gamme de couleur du jaune pâle au jaune foncé indique une activité CAT. Ce changement de couleur est due à la réaction du DTNB avec le groupe libre sulfhydryl du coenzyme A dont la production est dépendante de la présence d'une chloramphénicol acetyl transferase.

Chez les bactéries entériques, la chloramphénicol acetyl transferase catalyse deux réactions conduisant à la di-acétylation du chloramphénicol.

CAT + chloramphenicol + acetyl-S-coenzyme A ⇨ chloramphenicol-3-acetate + hydrogen sulfide-coenzyme A

CAT + chloramphenicol-3-acetate + acetyl-Scoenzyme A ⇨ chloramphenicol-1,3-diacetate + hydrogen sulfide-coenzyme A.

XIII.10 Séquençage du plasmide pCCK13698

Le séquençage du plasmide PCCK13698 a été réalisé en Allemagne par « Institut für Tierzucht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft ».
L'ADN plasmidique correspondant au plasmide pCCK13698 a été extrait par la méthode de lyse alcaline à partir des transformants *P.multocida.* Le plasmide a été soumis à une digestion par l'enzyme *Ssp*I et les fragments de restrictions ont été clonés dans les vecteurs pCR-Blunt® II-TOPO (Invitrogen). Les plasmides obtenus ont ensuite été transformés dans des souches réceptrices *E.coli* TOP10. Le séquençage, réalisé par la méthode de « dideoxy chain termination » (MWG Biotech), a été démarré avec les amorces forward et reverse M13 puis a été complété avec des amorces définies à partir des premières séquences obtenues.

XIV. Technique de mutagénèse.

XIV.1 Technique « one-step inactivation of chromosomal gene".

La délétion de SGI1 du génome de la souche *S.*Typhimurium 1948Sa96, a été réalisée par la technique « one-step inactivation of chromosomal gene » mise au point par Datsenko et Wanner [119].

La stratégie consiste à remplacer par recombinaison homologue, une séquence chromosomique (ici SGI1) par un gène de résistance. A l'aide d'amorces portant des extensions homologues au gène cible, on génère un produit PCR constitué d'un gène de résistance entouré de deux séquences homologues aux régions entourant la séquence chromosomique à déléter. Le produit PCR, introduit dans la souche à muter par transformation, permet la mise en place d'une recombinaison homologue aidée par le plasmide Red Helper pKD46. Suite à la recombinaison et à la sélection des souches recombinantes, il est possible d'éliminer le gène de résistance à l'aide du plasmide FLP recombinase qui agit sur les sites FRT répétés de part et d'autre du gène de résistance.

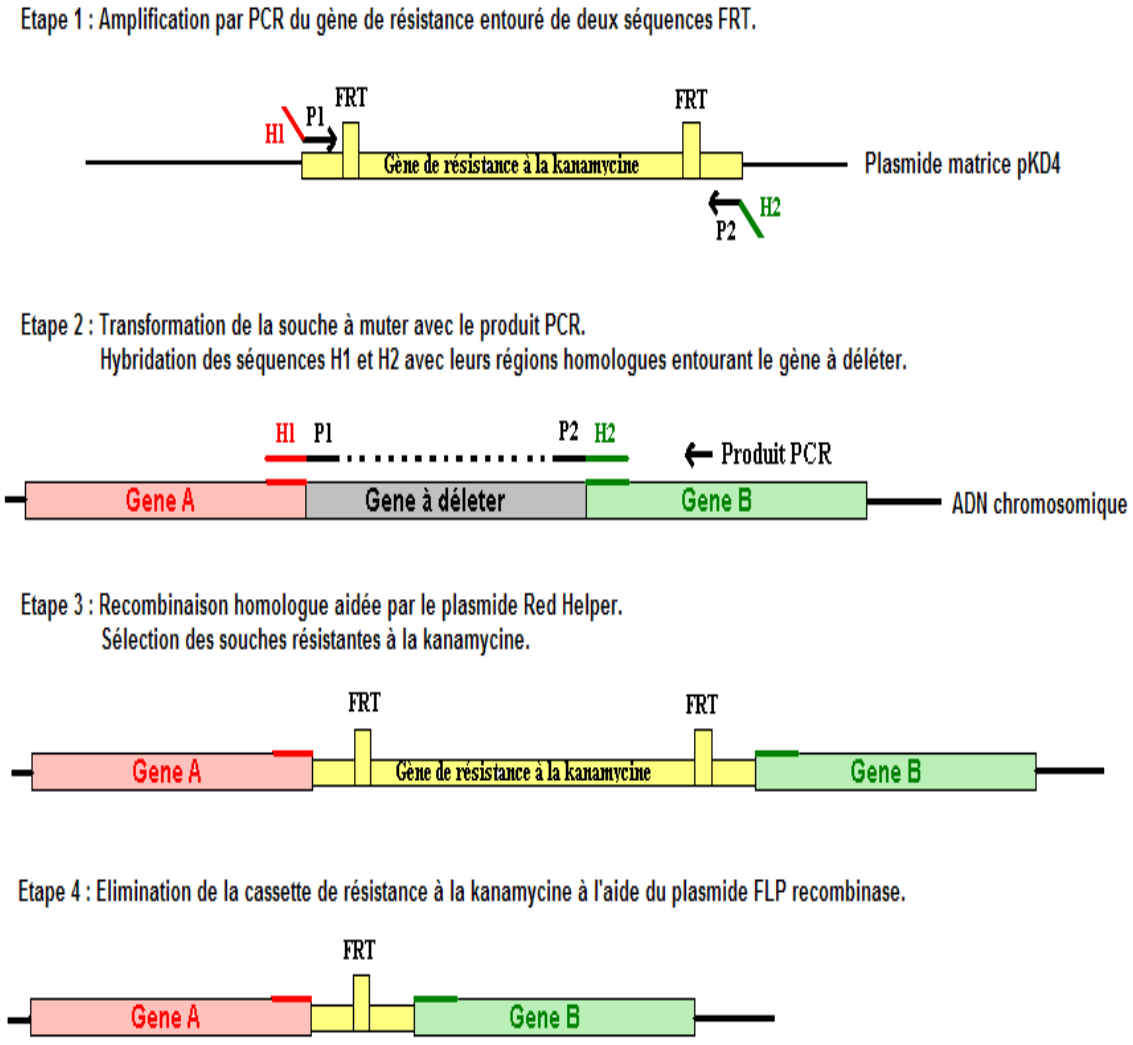
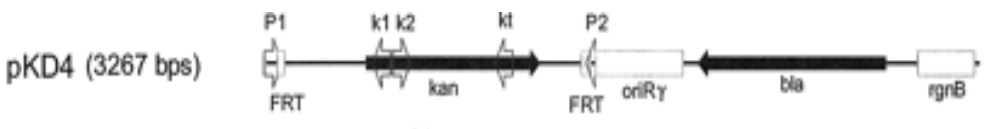


Figure 74 : Principe du système de mutagénèse « one-step inactivation of chromosomal gene »

Le produit PCR utilisé dans cette technique est généré à partir d'un plasmide matrice pKD4 qui dérive du plasmide pANTTS→ modifié par l'insertion d'une séquence provenant du plasmide pCP15 et qui comprend une cassette de résistance à la kanamycine entourée de séquences FRT (FLP recognition target) [119].



XIV.2 Modification du plasmide Red Helper pKD46.

La technique « one-step inactivation of chromosomal gene » nécessite l'utilisation du plasmide Red Helper pKD46 qui porte la Red recombinase du phage λ, synthétisée sous contrôle du promoteur P_{araB} induit par l'arabinose. Le système Red inclue trois gènes : *γ*, *β* et *exo* codant respectivement pour les produits Gam, Bet et Exo. Gam inhibe l'exonucléase V de l'hôte permettant aux recombinases Bet et Exo d'avoir accès aux extrémités de l'ADN et de promouvoir ainsi la recombinaison. Le plasmide pKD46 possède, en outre, un gène de résistance à l'ampicilline et une origine de réplication thermosensible. Il se réplique à 30°C et est facilement éliminable à 37°C.

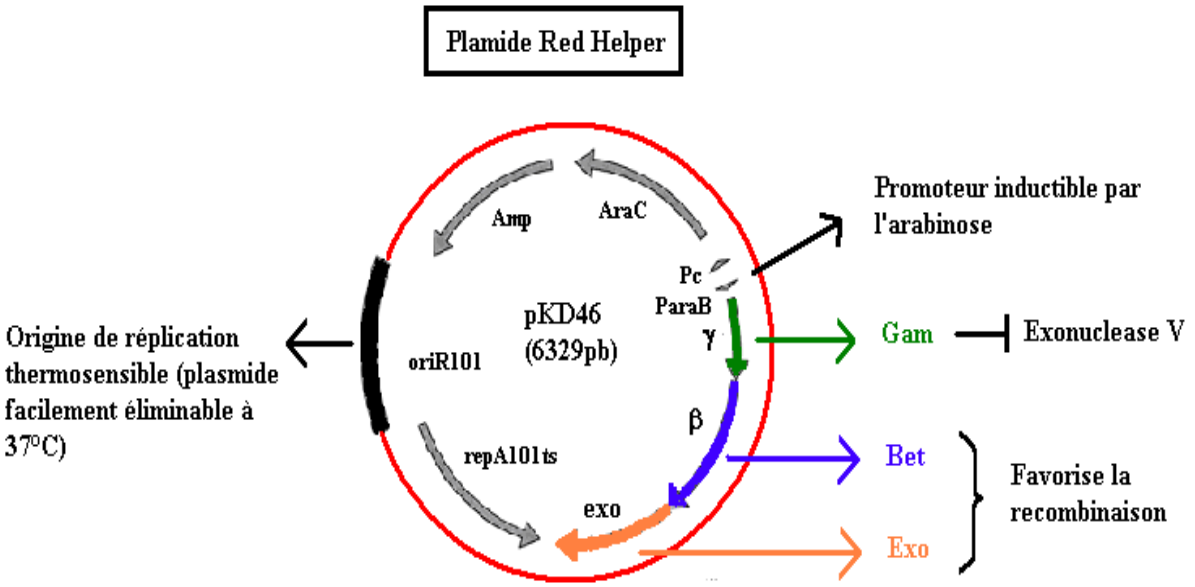


Figure 75 : Structure du plasmide Red Helper pKD46 utilisé dans le système de mutagénèse « one-step inactivation of chromosomal gene »

La première étape de l'inactivation consiste à transformer la souche à muter avec le plasmide Red Helper pKD46 puis de sélectionner les souches transformées qui sont résistantes à l'ampicilline. Or, du fait de la présence de SGI1, la souche *S.*Typhimurium 1948Sa96 présente un phénotype de multirésistance incluant la résistance à l'ampicilline. Une modification du plasmide Red Helper pKD46 a été requise afin de changer le phénotype de résistance qu'il confère. La description détaillée de la modification effectuée a été décrite dans les Résultats chapitre X.

XV. Modèle murin de salmonellose systémique appliqué aux souches Salmonella Typhimurium.

Le modèle murin est le modèle reconnu pour l'étude de la virulence des salmonelles par la communauté scientifique internationale. Les animaux utilisés doivent être de phénotype sensible c'est-à-dire NRamp-/-. Dans ce modèle, les salmonelles provoquent une infection systémique létale.
Deux paramètres sont généralement étudiés : le niveau de colonisation des rates au pic d'infection et la létalité.

XV.1 Détermination de la dose d'inoculation et du pic d'infection chez des souris BalbC inoculées par des souches de Salmonella Typhimurium.

Le protocole présenté ici est une expérimentation préliminaire qui nous a permis de déterminer la dose d'inoculation et le délai post-inoculation pour être au pic d'infection chez des souris Balb/C inoculées par des souches de *Salmonella* Typhimurium.

Les animaux, obtenus par l'INRA Nouzilly, sont inoculés par voie orale à l'aide de biberons à J0 avec une dose de 10^5, 10^6, 10^7 ou 10^8 bactéries. Cinq souris par souche et par dose ont été utilisées, soit 12 lots de cinq souris.
Les souches à tester sont repiquées dans 10 ml de bouillon TSB et incubées à 37°C pendant la nuit. 2 ml de la préculture de chaque souche sont ensemencés dans 200 ml de bouillon TSB et incubés 24 heures à 37 °C. Les cultures sont ensuite centrifugées 20 minutes à 4500 rpm à 4°C et les culots sont repris dans 5 ml de solution glycérol à 50%. La solution obtenue est titrée et répartie dans cinq cryotubes mis au congélateur à -80°C.

A partir de la solution de départ titrée à 10^{11} bactéries, les inocula ont été préparés par une série de dilution pour une obtenir une solution finale d'un volume de 100 ml contenant la quantité de bactéries adéquate pour chaque dose testée. Cette quantité a été déterminée en prenant en compte le fait qu'une souris boit approximativement 5 ml de liquide en 24 heures.
Les solutions obtenues ont ensuite été transvasées dans un biberon et l'ensemble a été pesé.
Afin d'être sûr que les souris ingèrent les inocula, elles ont été soumises à un jeun les 24 heures précédant le début de l'expérimentation. Après la pose des biberons, chaque cage est

recouverte avec un couvercle filtrant pour éviter les contaminations. D'autre part, les inocula ont été soumis à une titration pour vérifier les doses ingérées.
Après 24 h, les biberons sont récupérés et pesés pour déterminer le volume de solution ingérée par les souris. Le volume mesuré, associé à la titration des inocula, a permis de déterminer la dose approximativement ingérée par souris.

L'évolution de l'infection est alors suivie. Les animaux sont visités quotidiennement tant que les souris ont une bonne activité. Dès que les souris sont atteintes des symptômes caractéristiques d'une salmonellose systémique, elles sont visitées 2 fois par jour. Ces symptômes incluent les poils hérissés, une activité réduite, le dos rond. Pendant cette période critique, les animaux en phase terminale sont euthanasiés lorsque l'on considère que l'animal décèdera dans la ½ journée suivante.

XV.2 Suivi de la létalité et mesure du taux de colonisation des rates au pic d'infection.

Les animaux sont inoculés par voie orale à l'aide de biberons à J0 avec une dose de 10^8 bactéries. Deux lots différents de dix souris par souche et par dose ont été utilisés, un lot dit « létalité » et un lot dit « colonisation des rates », soit 14 lots de dix souris.

La préparation des inocula et la détermination des doses ingérées par les souris ont été réalisées comme décrits dans le chapitre précédent.

Pour le lot « létalité », l'évolution de l'infection est suivie quotidiennement. Les animaux inoculés avec une souche virulente meurent en général entre 8 et 11 jours post-inoculation. Deux possibilités pour les animaux inoculés avec une souche présentant une virulence atténuée : soit la cinétique de létalité est retardée, soit les souris arrivent à surmonter l'infection et ne présentent plus aucun symptôme 2 semaines post-inoculation environ.

Pour le lot « colonisation des rates », les animaux sont euthanasiés par élongation cervicale au pic d'infection déterminé à J+6 post inoculation à l'aide de l'expérience préliminaire. La rate est prélevée de manière aseptique sur chacun des animaux et placée dans un sac stérile

préalablement pesé. Les rates sont alors congelées telles quelles à – 80°C. Le lendemain, les rates sont décongelées, broyées dans le sac à l'aide d'un rouleau puis homogénéisées.
La solution obtenue est soumise à une série de dilution et 0,2 ml de chaque dilution est déposée sur deux boites de géloses TSA mises à incuber à 37°C. Le lendemain, le niveau de colonisation des rates est déterminé par comptage des colonies obtenues, et une analyse statistique est réalisée.

XVI. Etude des biofilms.

XVI.3 Morphologie des colonies et mis en évidence de la synthèse de cellulose.

XVI.3.1 Etude de la morphologie des colonies.

Les bactéries à analyser sont cultivées 18 heures à 37°C. Les cultures bactériennes subissent une série de dilution et sont étalées sur géloses LB. Les boites de gélose sont alors incubées soit à 37°C, soit à 28°C. Au bout de 96h, on observe les géloses sur lesquelles environ une dizaine de colonies isolées ont été formées.

XVI.3.2 Test au calcofluor.

Le calcofluor est un agent fluorescent capable de lier les chaines de glucose liées en β (1-4) qu'on retrouve notamment dans la structure de la cellulose.
Pour mettre en évidence la synthèse de cellulose, on procède comme précédemment décrit dans le paragraphe XVI.3.1 avec des géloses LB supplémentées en calcofluor (Fluorescent Brightener, SIGMA) à 20µg/ml. Au bout de 96 heures, les boites sont observées sous une source UV pour détecter les colonies produisant une fluorescence.

XVI.4 Etude de la formation de biofilm en plaques 96 puits.

Le système expérimental utilisé, également appelé « essai en plaque 96 puits » est une méthode simple permettant de contrôler et quantifier l'attachement de bactéries sur une surface abiotique [120, 121].

Les bactéries sont cultivées en milieu ¼ LB pendant 18 heures. Les cultures sont ensuite diluées jusqu'à obtention d'une DO égale à 0.1. 200 µl de chaque culture diluée sont inoculés dans chaque puits de la microplaque 96 puits stérile. On inocule 8 puits par souche étudiée.
Après inoculation, la plaque est mise à incuber 96 heures à 28°C sans agitation pour permettre aux cellules d'adhérer à la surface du puits et d'y former un biofilm.
Après incubation, les puits sont vidés puis rincés à l'eau stérile trois fois de suite afin d'éliminer totalement les bactéries restées sous forme planctonique. Une incubation d'une heure à 60°C permet la fixation du biofilm dans le puits.
On ajoute alors 200 µl par puits de solution de cristal violet 0.4%, un colorant qui se fixe sur le biofilm et qui permet sa visualisation à l'œil nu. On laisse agir le cristal violet 30 minutes à température ambiante puis la plaque est à nouveau rincée trois fois de suite avec de l'eau stérile afin d'éliminer le colorant qui ne s'est pas fixé sur les cellules adhérentes.
Le cristal violet est dissout en ajoutant 200 µl d'éthanol à 95% dans chaque puits.
La solution est alors transvasée dans un microtube et ajustée à 1 ml avec de l'eau distillée.
L'absorbance de la solution est mesurée au spectrophotomètre à 570 nm et soustrait à l'absorbance de la solution témoin. La quantité de colorant dissout étant proportionnelle à la quantité de biofilm formée, l'absorbance mesurée est représentative de la production de biofilm.

XVI.5 Etude de la formation de biofilm en plaques 24 puits.

Le système expérimental choisi ici permet d'évaluer le pourcentage d'adhérence des souches étudiées qui se définit par le pourcentage des cellules contribuant à la formation du biofilm dans une culture bactérienne donnée.

Les bactéries sont cultivées en milieu ¼ LB pendant 18 heures. Les cultures sont ensuite diluées en milieu ¼ LB jusqu'à obtention d'une DO égale à 0.1. 2 ml de chaque culture diluée sont inoculés dans chaque puits de la microplaque 24 puits stérile. On inocule 3 puits par souche étudiée.
Après inoculation, la plaque est mise à incuber 96 heures à 28°C sans agitation pour permettre aux cellules d'adhérer à la surface du puits et d'y former un biofilm.
Après incubation, le surnageant, comprenant les cellules non adhérées, est récupéré dans un microtube. Afin de récupérer la totalité des bactéries planctoniques, les puits sont rincés deux fois avec 1 ml de milieu ¼ LB que l'on ajoute au surnageant récupéré initialement.

L'étape suivante consiste à récupérer le biofilm formé en grattant l'intérieur des puits. On ajoute donc 1 ml de milieu LB dans chaque puits que l'on gratte avec une pointe à filtre. La solution est homogénéisée et transvasée dans un microtube. L'opération est renouvelée une fois.

Deux solutions ont été récupérées. L'une contenant les bactéries restées sous forme planctoniques, l'autre contenant les cellules ayant adhérées aux puits.

La mesure des quantités de cellules récupérées est réalisée par lecture au spectrophotomètre à 600 nm.

On calcule alors le pourcentage d'adhérence : DO des cellules adhérées / (DO des cellules adhérées + DO des cellules planctoniques)

XVI.6 Détection du polysaccharide capsulaire par la méthode ELLA.

La méthode ELLA (Enzyme-linked Lectinsorbent Assay) [88, 122] utilisée ici permet de détecter et quantifier le polysaccharide capsulaire qui est un des principaux constituants de la matrice extracellulaire. Elle permet donc une mesure indirecte de la quantité de biofilm formée. Ce qui permettra de conforter les résultats obtenus avec les deux méthodes de quantification de biofilm décrites dans les paragraphes précédents.

Cette méthode repose sur la spécificité des lectines envers leurs substrats. La lectine est une protéine qui se lie spécifiquement et de façon réversible à un oligoside. Le polysaccharide capsulaire est composé, entre autres, des résidus saccharidiques D-glucose et D-mannose auxquels se fixent spécifiquement la lectine « concanavalin A ».

Les bactéries sont cultivées en milieu ¼ LB pendant 18h. Les cultures bactériennes sont ensuite diluées jusqu'à obtention d'une DO de 0.1. 200 µl de chaque culture diluée sont inoculés dans chaque puits de la microplaque 96 puits stérile. On inocule 2 puits par souche étudiée.

Après inoculation, la plaque est mise à incuber 96 heures à 28°C sans agitation pour placer les cellules en condition de formation de biofilm.

Après incubation, la DO de chaque puits est mesurée à 600 nm à l'aide d'un lecteur ELISA afin de mesurer la quantité de cellules présentes dans le surnageant.

Les surnageants de chaque puits sont ensuite transvasés dans un microtube auquel on ajoute 2 µl de concanavalin A marquée à la peroxydase (1mg/ml) soit 2 µg. A cette étape, la concanavalin A se fixe sur les polysaccharides capsulaires produits par les bactéries planctoniques mises en condition de formation de biofilm.

Après une heure, la culture est centrifugée à 10 000 g pendant 1 min. Puis on procède à 3 lavages successifs avec 200 µl de tampon dilué (PBS, 0.05% Tween 20) pour éliminer les lectines non liées.

100 µl de solution ABTS (2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) sont alors ajoutés. Il s'agit d'un substrat de la peroxydase qui produit un composé soluble de couleur verte dont l'absorbance peut être mesurée à 405 nm.

La réaction enzymatique catalysée par la peroxydase se déroule 15 minutes dans le noir puis est stoppée avec du SDS.

L'absorbance mesurée à 405 nm à l'aide du lecteur ELISA est divisée par l'absorbance mesurée à 600 nm pour obtenir la production de polysaccharide par cellule.

XVI.7 Etude de la motilité.

Les bactéries sont cultivées en milieu LB pendant la nuit. Le lendemain, 1 µl de la culture est inoculé à l'intérieur de géloses molles LB 0.5% en piquant avec une pointe à filtre 2 à 3 mm sous la surface. Les boites de géloses sont incubées à 37°C. Les cellules qui possèdent les structures adéquates de motilité vont se déplacer de manière circulaire autour du point de piqure créant un halo clair. Plus la bactérie est motile, plus le diamètre du halo obtenu sera élevé. La mesure des diamètres est effectuée à 4, 6 et 8 heures après inoculation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. François Denis, M.-C.P., ed. *Bactériologie médicale: techniques usuelles*2007, Elsevier Masson
2. Colin. *Fiche Salmonella spp*. 2002.
3. F, L.P. and M. Wierup, *Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products.* Rev Sci Tech, 2006. 25(2): p. 541-54.
4. Millemann, Y., *[Pathogenic power of Salmonellae: virulence factors and study models]*. Vet Res, 1998. 29(5): p. 385-407.
5. Schwarz, S. and E. Chaslus-Dancla, *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance.* Vet Res, 2001. 32(3-4): p. 201-25.
6. Cloeckaert, A. and S. Schwarz, *Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in Salmonella enterica typhimurium DT104.* Vet Res, 2001. 32(3-4): p. 301-10.
7. Bronzwaer, S.L., U. Buchholz, and J.L. Kool, *[International surveillance of antimicrobial resistance in Europe: now we also need to monitor antibiotic use]*. Euro Surveill, 2001. 6(1): p. 1-2.
8. Tenover, F.C., *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.* Am J Med, 2006. 119(6 Suppl 1): p. S3-10; discussion S62-70.
9. Harbottle, H., et al., *Genetics of antimicrobial resistance.* Anim Biotechnol, 2006. 17(2): p. 111-24.
10. Michael, G.B., et al., *Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in Salmonella: an update.* Microbes Infect, 2006. 8(7): p. 1898-914.
11. Braibant, M., et al., *Structural and functional study of the phenicol-specific efflux pump FloR belonging to the major facilitator superfamily.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(7): p. 2965-71.
12. Toussaint, A. and C. Merlin, *Mobile elements as a combination of functional modules.* Plasmid, 2002. 47(1): p. 26-35.
13. Boerlin, P. and R.J. Reid-Smith, *Antimicrobial resistance: its emergence and transmission.* Anim Health Res Rev, 2008. 9(2): p. 115-26.
14. Norman, A., L.H. Hansen, and S.J. Sorensen, *Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. 364(1527): p. 2275-89.
15. Mahillon, J., *Transposons as gene haulers.* APMIS Suppl, 1998. 84: p. 29-36.
16. Mahillon, J. and M. Chandler, *Insertion sequences.* Microbiol Mol Biol Rev, 1998. 62(3): p. 725-74.
17. Toleman, M.A., P.M. Bennett, and T.R. Walsh, *ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?* Microbiol Mol Biol Rev, 2006. 70(2): p. 296-316.
18. Burrus, V., et al., *Conjugative transposons: the tip of the iceberg.* Mol Microbiol, 2002. 46(3): p. 601-10.
19. Hall, R.M., *Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria.* Ciba Found Symp, 1997. 207: p. 192-202; discussion 202-5.
20. Recchia, G.D. and R.M. Hall, *Gene cassettes: a new class of mobile element.* Microbiology, 1995. 141 (Pt 12): p. 3015-27.
21. Mazel, D., et al., *A distinctive class of integron in the Vibrio cholerae genome.* Science, 1998. 280(5363): p. 605-8.
22. Rowe-Magnus, D.A., A.M. Guerout, and D. Mazel, *Super-integrons.* Res Microbiol, 1999. 150(9-10): p. 641-51.
23. Mulvey, M.R., et al., *The genetics of Salmonella genomic island 1.* Microbes Infect, 2006. 8(7): p. 1915-22.
24. Poppe, C., et al., *Salmonella typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen.* Can Vet J, 1998. 39(9): p. 559-65.

25. Threlfall, E.J., *Epidemic salmonella typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone.* J Antimicrob Chemother, 2000. 46(1): p. 7-10.
26. Helms, M., S. Ethelberg, and K. Molbak, *International Salmonella Typhimurium DT104 infections, 1992-2001.* Emerg Infect Dis, 2005. 11(6): p. 859-67.
27. Ribot, E.M., et al., *Salmonella enterica serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995.* Emerg Infect Dis, 2002. 8(4): p. 387-91.
28. Baggesen, D.L., D. Sandvang, and F.M. Aarestrup, *Characterization of Salmonella enterica serovar typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States.* J Clin Microbiol, 2000. 38(4): p. 1581-6.
29. Casin, I., et al., *Multidrug-resistant human and animal Salmonella typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamase PSE-1.* J Infect Dis, 1999. 179(5): p. 1173-82.
30. Prager, R., et al., *Clonal relationship of Salmonella enterica serovar typhimurium phage type DT104 in Germany and Austria.* Zentralbl Bakteriol, 1999. 289(4): p. 399-414.
31. Markogiannakis, A., et al., *Multiple clones within multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium phage type DT104. The Greek Nontyphoidal Salmonella Study Group.* J Clin Microbiol, 2000. 38(3): p. 1269-71.
32. Boyd, D.A., et al., *Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of Salmonella enterica Typhymurium DT104.* FEMS Microbiol Lett, 2000. 189(2): p. 285-91.
33. Boyd, D., et al., *Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona.* J Bacteriol, 2001. 183(19): p. 5725-32.
34. Brown, H.J., H.W. Stokes, and R.M. Hall, *The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives.* J Bacteriol, 1996. 178(15): p. 4429-37.
35. Partridge, S.R., et al., *Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(11): p. 3014-20.
36. Partridge, S.R., et al., *Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(4): p. 1263-70.
37. Kim, E. and T. Aoki, *Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish pathogen, Pasteurella piscicida.* Microbiol Immunol, 1996. 40(9): p. 665-9.
38. Zhao, J. and T. Aoki, *Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from Vibrio anguillarum.* Microbiol Immunol, 1992. 36(10): p. 1051-60.
39. Kim, E.H. and T. Aoki, *The transposon-like structure of IS26-tetracycline, and kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid of fish pathogen, Pasteurella piscicida.* Microbiol Immunol, 1994. 38(1): p. 31-8.
40. Briggs, C.E. and P.M. Fratamico, *Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of Salmonella typhimurium DT104.* Antimicrob Agents Chemother, 1999. 43(4): p. 846-9.
41. White, D.G., et al., *Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in Escherichia coli associated with bovine diarrhea.* J Clin Microbiol, 2000. 38(12): p. 4593-8.
42. Cloeckaert, A., et al., *Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the floR gene in Escherichia coli isolated from cattle.* Antimicrob Agents Chemother, 2000. 44(10): p. 2858-60.

43. Arcangioli, M.A., et al., *A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in Salmonella typhimurium DT104.* FEMS Microbiol Lett, 1999. 174(2): p. 327-32.
44. Kehrenberg, C. and S. Schwarz, *Plasmid-borne florfenicol resistance in Pasteurella multocida.* J Antimicrob Chemother, 2005. 55(5): p. 773-5.
45. Schnabel, E.L. and A.L. Jones, *Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards.* Appl Environ Microbiol, 1999. 65(11): p. 4898-907.
46. Bissonnette, L., et al., *Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (cmlA) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins.* J Bacteriol, 1991. 173(14): p. 4493-502.
47. Davis, M.A., et al., *Reply to drs. Angulo and collignon.* Emerg Infect Dis, 2000. 6(4): p. 437-8.
48. Boyd, D., et al., *Characterization of variant Salmonella genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(6): p. 1714-22.
49. Doublet, B., et al., *Variant Salmonella genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in Salmonella enterica serovar Albany.* Emerg Infect Dis, 2003. 9(5): p. 585-91.
50. Schwarz, S., et al., *Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol.* FEMS Microbiol Rev, 2004. 28(5): p. 519-42.
51. Doublet, B., et al., *Variant Salmonella genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, aac(3)-Id, in Salmonella enterica serovar newport.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. 48(10): p. 3806-12.
52. Mulvey, M.R., et al., *Emergence of multidrug-resistant Salmonella Paratyphi B dT+, Canada.* Emerg Infect Dis, 2004. 10(7): p. 1307-10.
53. Akiba, M., et al., *Detection and characterization of variant Salmonella genomic island 1s from Salmonella Derby isolates.* Jpn J Infect Dis, 2006. 59(5): p. 341-5.
54. Arlet, G., et al., *Salmonella resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology.* Microbes Infect, 2006. 8(7): p. 1945-54.
55. Ahmed, A.M., A.I. Hussein, and T. Shimamoto, *Proteus mirabilis clinical isolate harbouring a new variant of Salmonella genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region.* J Antimicrob Chemother, 2007. 59(2): p. 184-90.
56. Chiu, C.H., et al., *Variant Salmonella genomic island 1 antibiotic resistance gene clusters in Salmonella enterica serovar Derby isolates from humans in Taiwan.* J Antimicrob Chemother, 2007. 59(2): p. 325-6.
57. Levings, R.S., et al., *SGI1-K, a Variant of the SGI1 Genomic Island Carrying a Mercury Resistance Region, in Salmonella enterica Serovar Kentucky.* Antimicrob Agents Chemother, 2007. 51(1): p. 317-23.
58. Vo, A.T., et al., *A novel Salmonella genomic island 1 and rare integron types in Salmonella Typhimurium isolates from horses in The Netherlands.* J Antimicrob Chemother, 2007. 59(4): p. 594-9.
59. Boyd, D.A., et al., *Salmonella genomic island 1 (SGI1), variant SGI1-I, and new variant SGI1-O in proteus mirabilis clinical and food isolates from China.* Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(1): p. 340-4.
60. Doublet, B., et al., *Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of Salmonella enterica serovar Kentucky.* Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(10): p. 3745-54.

61. Levings, R.S., S.P. Djordjevic, and R.M. Hall, *SGI2, a relative of Salmonella genomic island SGI1 with an independent origin.* Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(7): p. 2529-37.
62. Vo, A.T., et al., *Antimicrobial resistance, class 1 integrons and a novel variant of Genomic Island 1 in Salmonella isolates from Vietnam.* Antimicrob Agents Chemother, 2008.
63. Djordjevic, S.P., et al., *Emergence and evolution of multiply antibiotic-resistant Salmonella enterica serovar Paratyphi B D-tartrate-utilizing strains containing SGI1.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(6): p. 2319-26.
64. Doublet, B., et al., *Truncated tni module adjacent to the complex integron of salmonella genomic island 1 in Salmonella enterica serovar Virchow.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(2): p. 824-7.
65. Doublet, B., et al., *Association of IS26-composite transposons and complex In4-type integrons generates novel multidrug resistance loci in Salmonella genomic island 1.* J Antimicrob Chemother, 2009. 63(2): p. 282-9.
66. Kim, S., et al., *An Additional Novel Antimicrobial Resistance Gene Cluster in Salmonella Genomic Island 1 of a Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104 Human Isolate.* Foodborne Pathog Dis, 2009.
67. Doublet, B., et al., *The Salmonella genomic island 1 is an integrative mobilizable element.* Mol Microbiol, 2005. 55(6): p. 1911-24.
68. Cloeckaert, A., S. Baucheron, and E. Chaslus-Dancla, *Nonenzymatic chloramphenicol resistance mediated by IncC plasmid R55 is encoded by a floR gene variant.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(8): p. 2381-2.
69. Doublet, B., et al., *Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable Salmonella genomic island 1.* PLoS ONE, 2008. 3(4): p. e2060.
70. Varma, J.K., et al., *Hospitalization and antimicrobial resistance in Salmonella outbreaks, 1984-2002.* Emerg Infect Dis, 2005. 11(6): p. 943-6.
71. Glynn, M.K., et al., *Emergence of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype typhimurium DT104 infections in the United States.* N Engl J Med, 1998. 338(19): p. 1333-8.
72. Martin, L.J., et al., *Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant Salmonella enterica serotype typhimurium infections.* J Infect Dis, 2004. 189(3): p. 377-84.
73. Helms, M., et al., *[Excess mortality associated with antibiotic resistant Salmonella typhimurium]*. Ugeskr Laeger, 2003. 165(3): p. 235-9.
74. Allen, C.A., et al., *In vitro and in vivo assessment of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 virulence.* Infect Immun, 2001. 69(7): p. 4673-7.
75. Carlson, S.A., et al., *Identification of diminished tissue culture invasiveness among multiple antibiotic resistant Salmonella typhimurium DT104.* Microb Pathog, 2000. 28(1): p. 37-44.
76. Carlson, S.A., et al., *Evaluation of invasion-conferring genotypes and antibiotic-induced hyperinvasive phenotypes in multiple antibiotic resistant Salmonella typhimurium DT104.* Microb Pathog, 2000. 28(6): p. 373-8.
77. Anriany, Y.A., et al., *Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype.* Appl Environ Microbiol, 2001. 67(9): p. 4048-56.
78. Mizunoe, Y., et al., *Isolation and characterization of rugose form of Vibrio cholerae O139 strain MO10.* Infect Immun, 1999. 67(2): p. 958-63.
79. Rice, E.W., et al., *Chlorine and survival of "rugose" Vibrio cholerae.* Lancet, 1992. 340(8821): p. 740.

80. Wai, S.N., et al., *Vibrio cholerae O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation.* Appl Environ Microbiol, 1998. 64(10): p. 3648-55.
81. Yildiz, F.H. and G.K. Schoolnik, *Vibrio cholerae O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(7): p. 4028-33.
82. White, A.P., et al., *Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of Salmonella.* J Bacteriol, 2006. 188(9): p. 3219-27.
83. Romling, U., et al., *Multicellular and aggregative behaviour of Salmonella typhimurium strains is controlled by mutations in the agfD promoter.* Mol Microbiol, 1998. 28(2): p. 249-64.
84. Zogaj, X., et al., *The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix.* Mol Microbiol, 2001. 39(6): p. 1452-63.
85. Romling, U., *Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae.* Cell Mol Life Sci, 2005. 62(11): p. 1234-46.
86. White, A.P. and M.G. Surette, *Comparative genetics of the rdar morphotype in Salmonella.* J Bacteriol, 2006. 188(24): p. 8395-406.
87. Kim, S.H. and C.I. Wei, *Biofilm formation by multidrug-resistant Salmonella enterica serotype typhimurium phage type DT104 and other pathogens.* J Food Prot, 2007. 70(1): p. 22-9.
88. Malcova, M., et al., *Biofilm formation in field strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation.* Vet Microbiol, 2007.
89. Watnick, P. and R. Kolter, *Biofilm, city of microbes.* J Bacteriol, 2000. 182(10): p. 2675-9.
90. Aparna, M.S. and S. Yadav, *Biofilms: microbes and disease.* Braz J Infect Dis, 2008. 12(6): p. 526-30.
91. Monds, R.D. and G.A. O'Toole, *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review.* Trends Microbiol, 2009. 17(2): p. 73-87.
92. Karatan, E. and P. Watnick, *Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms.* Microbiol Mol Biol Rev, 2009. 73(2): p. 310-47.
93. Solano, C., et al., *Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose.* Mol Microbiol, 2002. 43(3): p. 793-808.
94. Stewart, P.S. and M.J. Franklin, *Physiological heterogeneity in biofilms.* Nat Rev Microbiol, 2008. 6(3): p. 199-210.
95. Costerton, J.W., et al., *Biofilms, the customized microniche.* J Bacteriol, 1994. 176(8): p. 2137-42.
96. Lewis, K., *Persister cells and the riddle of biofilm survival.* Biochemistry (Mosc), 2005. 70(2): p. 267-74.
97. Shah, D., et al., *Persisters: a distinct physiological state of E. coli.* BMC Microbiol, 2006. 6: p. 53.
98. Ahmer, B.M., *Cell-to-cell signalling in Escherichia coli and Salmonella enterica.* Mol Microbiol, 2004. 52(4): p. 933-45.
99. Boyen, F., et al., *Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives.* Vet Microbiol, 2009. 135(3-4): p. 187-95.
100. Walters, M. and V. Sperandio, *Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella.* Int J Med Microbiol, 2006. 296(2-3): p. 125-31.

101. Pilousova, L., et al., *Retron reverse transcriptase (rrtT) can be lost in multidrug resistant Salmonella enterica serovar Typhimurium DT 104 strains and influences virulence for mice.* Vet Microbiol, 2005. 111(3-4): p. 191-7.
102. Ward, A.C., et al., *Characterization of Pasteurella spp isolated from healthy domestic pack goats and evaluation of the effects of a commercial Pasteurella vaccine.* Am J Vet Res, 2002. 63(1): p. 119-23.
103. Dyer, N.W., et al., *Seasonal incidence and antibiotic susceptibility patterns of Pasteurellaceae isolated from American bison (Bison bison).* Can J Vet Res, 2001. 65(1): p. 7-14.
104. Catry, B., et al., *tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of Pasteurella and Mannheimia spp.* Vet Microbiol, 2004. 98(3-4): p. 251-60.
105. Scholz, P., et al., *Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010.* Gene, 1989. 75(2): p. 271-88.
106. Lancashire, J.F., et al., *Plasmid-encoded Tet B tetracycline resistance in Haemophilus parasuis.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(5): p. 1927-31.
107. Kehrenberg, C. and S. Schwarz, *Nucleotide sequence and organization of plasmid pMVSCS1 from Mannheimia varigena: identification of a multiresistance gene cluster.* J Antimicrob Chemother, 2002. 49(2): p. 383-6.
108. Daly, M., et al., *Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated Salmonella serotypes.* J Antimicrob Chemother, 2005. 55(4): p. 558-61.
109. Hendrikx, P., et al., *Development of performance indicators for the bovine clinical salmonellosis surveillance network in France.* J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2005. 52(10): p. 465-75.
110. Weill, F.X., et al., *Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of Salmonella enterica serotype Virchow in poultry and humans in France.* J Clin Microbiol, 2004. 42(12): p. 5767-73.
111. Doublet, B., et al., *Novel plasmid-encoded ceftazidime-hydrolyzing CTX-M-53 extended-spectrum beta-lactamase from Salmonella enterica serotypes Westhampton and Senftenberg.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(5): p. 1944-51.
112. Baucheron, S., et al., *The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in Salmonella enterica serovar typhimurium phage type DT204.* Microb Drug Resist, 2002. 8(4): p. 281-9.
113. Izumiya, H., et al., *Characterization of isolates of Salmonella enterica serovar typhimurium displaying high-level fluoroquinolone resistance in Japan.* J Clin Microbiol, 2005. 43(10): p. 5074-9.
114. Carrique-Mas, J.J., et al., *Trends in phage types and antimicrobial resistance of Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated from animals in Great Britain from 1990 to 2005.* Vet Rec, 2008. 162(17): p. 541-6.
115. Carrique-Mas, J.J., et al., *Observations related to the Salmonella EU layer baseline survey in the United Kingdom: follow-up of positive flocks and sensitivity issues.* Epidemiol Infect, 2008. 136(11): p. 1537-46.
116. Girlich, D., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in Escherichia coli isolates from healthy poultry in France.* Appl Environ Microbiol, 2007. 73(14): p. 4681-5.
117. Madec, J.Y., et al., *Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae strains from cattle in France.* J Clin Microbiol, 2008. 46(4): p. 1566-7.
118. Popoff, M.Y., et al., *Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme.* Res Microbiol, 2001. 152(10): p. 907-9.

119. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(12): p. 6640-5.
120. Christensen, G.D., et al., *Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.* J Clin Microbiol, 1985. 22(6): p. 996-1006.
121. O'Toole, G.A., et al., *Genetic approaches to study of biofilms.* Methods Enzymol, 1999. 310: p. 91-109.
122. Leriche, V., P. Sibille, and B. Carpentier, *Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms.* Appl Environ Microbiol, 2000. 66(5): p. 1851-6.

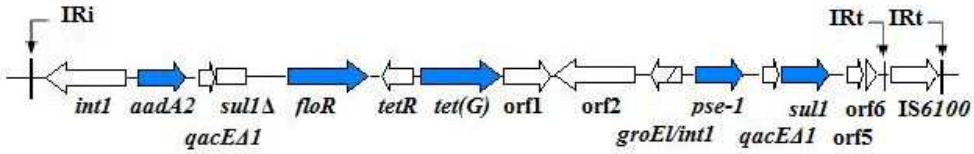
ANNEXES

Liste des variants SGI1 .

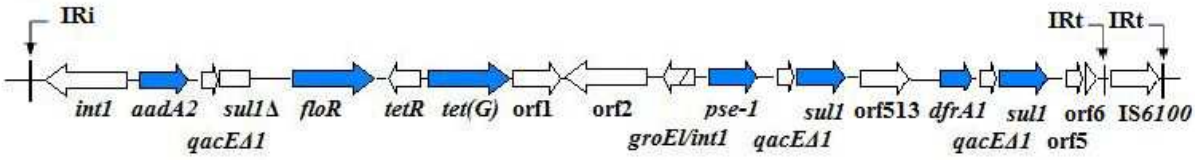
Phénotype, résistance à

A ampicilline
C chloramphénicol, florfénicol
S streptomycine, spectinomycine
Su sulfamides
T tétracyclines
Tmp triméthoprime
Gm gentamicine
K kanamycine
Hg mercure

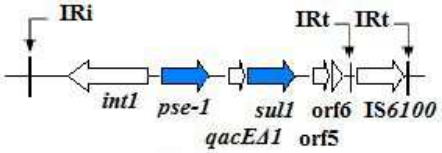
SGI1 Boyd, Peters 2001 Phénotype ACSSuT



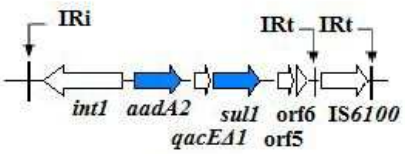
SGI1-A Boyd, Cloeckaert 2000 Phénotype ACSSuTTmp



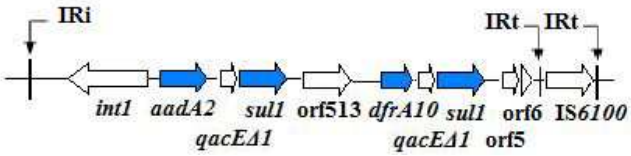
SGI1-B Boyd, cloeckaert 2002 Phénotype ASu



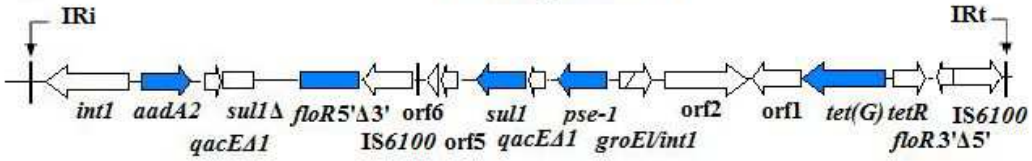
SGI1-C Boyd, Cloeckaert 2002 Phénotype SSu



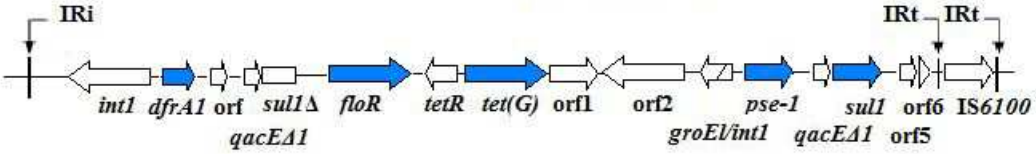
SGI1-D Boyd, Cloeckaert 2002 Phénotype SSuTmp



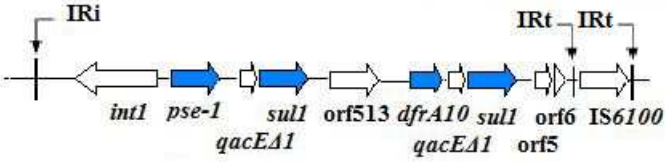
SGI1-E Boyd, Cloeckaert 2002 Phénotype ASSuT



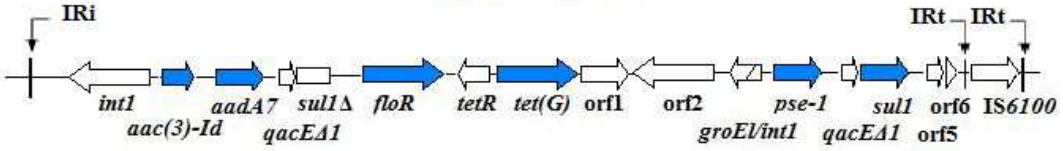
SGI-F Doublet, Lailler 2003 Phénotype ACSuTTmp



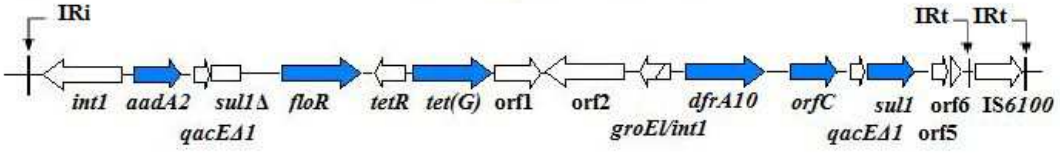
SGI1-G Doublet, Butave 2004 Phénotype ASuTmp



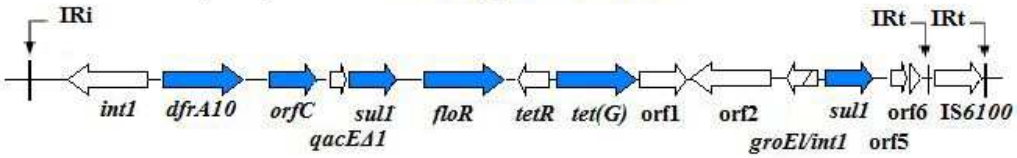
SGI1-H Doublet,Weill 2004 Phénotype ACSSuTGm



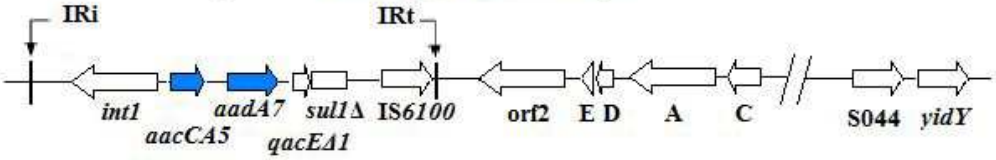
SGI1-I Akiba, Nakamura 2006 Phénotype CSSuTTmp



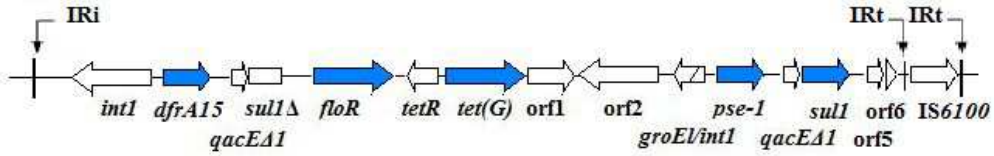
SGI1-J Mulvey, Boyd 2006 Phénotype CSuTTmp



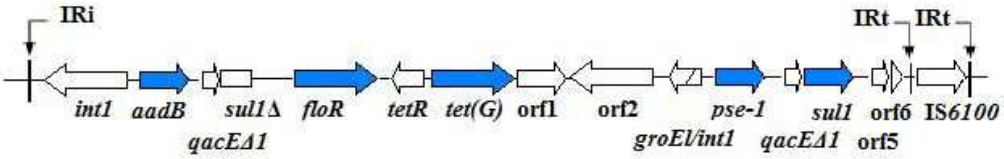
SGI1-K Levings 2006 Phénotype SSuGmHg



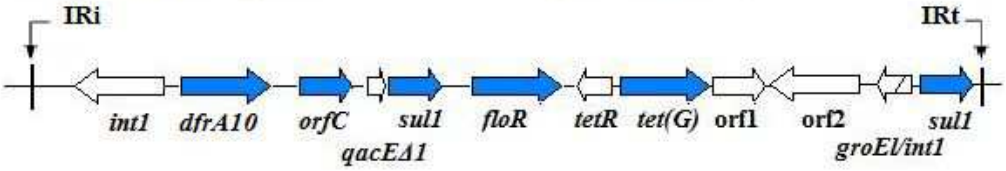
SGI1-L Cloeckaert 2006 in *P.mirabilis* (Ahmed, Hussein 2006) Phénotype ACSuTTmp



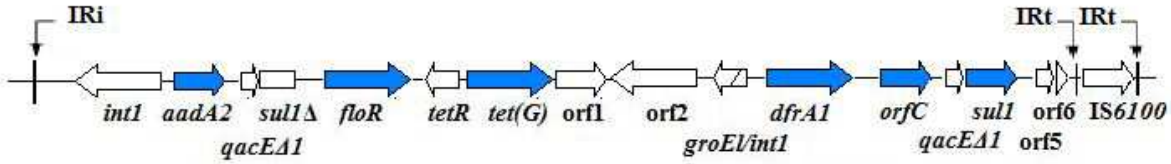
SGI1-M Vo, Duijkeren 2006 Phénotype ACSuTGmK



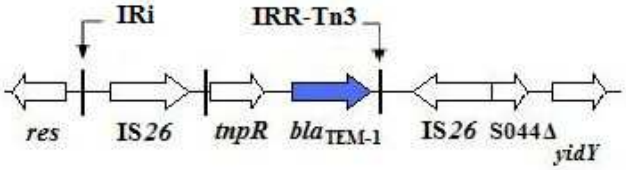
SGI1-N Vo, Duijkeren 2007 Phénotype CSuTTmp



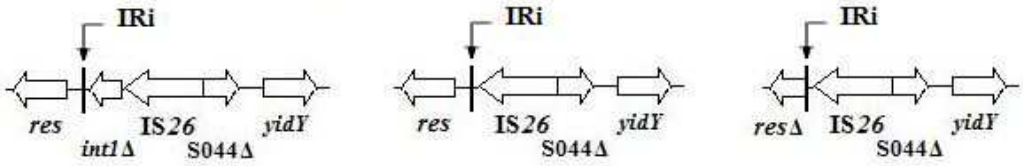
SGI1-O Boyd, Shi 2007 Phénotype CSSuTTmp



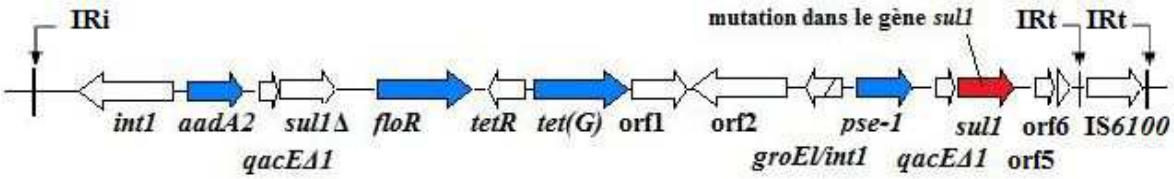
SGI1-P1 et SGI1-P2 Doublet 2008 Phénotype A



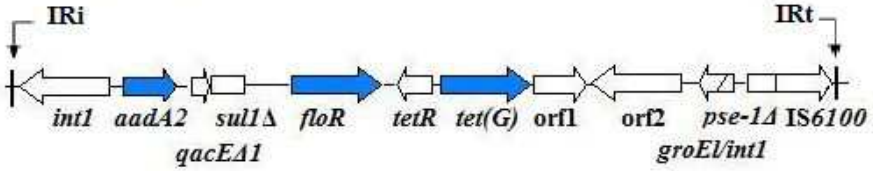
SGI1-Q1, SGI1-Q2 et SGI1-Q3 Doublet 2008



SGI1-R Djordjevic 2009 Phénotype ACST



SGI1-T Targant, Madec 2010 Phénotype CST



Liste des communications.

Publications

Article 1. Paru dans "Foodborne Pathogens and disease"

Targant H, Ponsin C, Brunet C et al. Characterization of Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Salmonella* enterica Serotype Typhimurium Isolated from Diseased Cattle in France (2002 to 2007). *Foodborne Pathog Dis.* 2010 Jan 21.

Article 2. Paru dans "Journal of Antimicrobial Chemotherapy"

Targant H, Doublet B, Aarestrup F.A, Cloeckaert A and Madec J-Y. IS*6100*-mediated genetic rearrangement within the complex class 1 integron In104 of the *Salmonella* genomic island 1. *J Antimicrob Chemother* 2010, sous presse

Article 3. Soumis à Veterinary Microbiology.

Targant H., Prigent-Combaret C., Haenni M., Giraud E., Mulvey M., Doublet B., Cloeckaert A. and Madec J.-Y.. Characterization of biofilm-forming abilities of isogenic mutants of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* carrying or not SGI1**.**

Article 4. Paru dans "Journal of Microbiology Methods"

Doublet B, Douard G, **Targant H** et al. Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J Microbiol Methods* 2008; **75**: 359-61.

Article 5. Paru dans "Journal of Antimicrobial Chemotherapy"

Kehrenberg C, Meunier D, **Targant H** et al. Plasmid-mediated florfenicol resistance in *Pasteurella trehalosi*. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 13-7.

Poster 1.

Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from cattle in France (2002 to 2007). H.Targant, D. Meunier, Brunet C, Ponsin C., Cloeckaert A and Madec J.Y.

Poster présenté au 2ème symposium « Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE 2007).

Communications orales

« Etude de la variabilité d'un îlot génomique de multiresistance aux antibiotiques, *Salmonella* Genomic Island I, et son implication dans la virulence ».
Présentée à la 12ème journée scientifique de l'EDISS, France, Villeurbanne, 2007.
Présentée à la Journée des doctorants de l'AFSSA, France, Maisons-Alfort, 2007.

Articles publiés et soumis.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published May 18, 2010

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkq163

IS*6100*-mediated genetic rearrangement within the complex class 1 integron In104 of the *Salmonella* genomic island 1

Hayette Targant[1], Benoît Doublet[2], Frank M. Aarestrup[3], Axel Cloeckaert[2] and Jean-Yves Madec[1]*

[1]*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon, France;* [2]*INRA, UR1282, Infectiologie Animale Santé Publique, IASP, 37380 Nouzilly, France;* [3]*National Food Institute, Technical University of Denmark, Kemitorvet, Building 204, 2800 Lyngby, Denmark*

*Corresponding author. Tel: +33-(0)4-78-69-68-30; Fax: +33-(0)4-78-61-91-45; E-mail: jy.madec@afssa.fr

Keywords: multidrug-resistant *Salmonella*, SGI1, variant, IS*6100*

Sir,

Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 (where DT stands for definitive type) emerged during the 1980s as a cause of many outbreaks in humans and animals, most isolates exhibiting resistance to a core group of antimicrobials including ampicillin/amoxicillin, chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin, sulphonamides and tetracyclines (ACSSuT phenotype).[1] The genes responsible were shown to be located on a 13 kb multidrug resistance region (MDR region) that constitutes a complex class 1 integron. This cluster, recently named In104, belongs to the integron In4 group and is located in a 43 kb genomic island named *Salmonella* genomic island 1 (SGI1).[1] Several variants of SGI1 have also been described over time in a wide variety of *S. enterica* serovars and in *Proteus mirabilis*.[1]

In this study, we examined an *S. enterica* serovar Typhimurium strain 72-21880-11 isolated from the faeces of a healthy cow in Denmark in 2000, which displayed resistance to chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin and tetracycline. To assess whether this strain harbours SGI1, PCRs were performed using primers corresponding to the left and right junctions of SGI1 in the *Salmonella* chromosome as described previously.[2] PCR results were positive for the left junction with the chromosomal *thdF* gene and for the right junction with the *int2* gene of the retron sequence specifically found downstream of SGI1 in the serovar Typhimurium, indicating that this strain contained SGI1 at the same location as in other isolates.[2] To confirm the presence of the entire SGI1, PCR mapping of the 5′ region of SGI1 (the first 10 kb) was performed as described previously.[3] All of the PCR results were positive. The presence of the remaining non-MDR region of SGI1 was assessed by Southern blot hybridization of XbaI-digested genomic DNA with the p1-9 probe as previously described.[2] The Southern blot profile of the serovar strain 72-21880-11 was similar to that obtained for the control strain of serovar Typhimurium DT104 harbouring SGI1 with two XbaI fragments of 4 and 9 kb (data not shown). To confirm the location of the MDR region within SGI1, PCRs were performed using primers S026-FW/int-RV and DB-T1/MDR-B[4] corresponding to the boundaries of the integron with the SGI1 backbone. The two PCRs gave positive results, indicating that the MDR region was at the normal position within the SGI1 backbone, i.e. between the *res* gene and the open reading frame S044.

The unusual resistance pattern of the strain 72-21880-11 suggests that genetic variations occurred within the In104 complex integron, which were assessed by PCR mapping of the antibiotic resistance gene cluster as described previously[5] (Figure 1a). All PCR products were obtained except the one corresponding to fragment E specific for the bla_{PSE-1} gene cassette. This result was confirmed by the cassette-array PCR for which only one fragment of 1 kb was obtained, corresponding to the *aadA2* gene cassette. Additional PCRs were also carried out, indicating that the variant region is located downstream of orf2 (data not shown). The region between *groEL/int1* and IS*6100* was then amplified by PCR and the 1.2 kb product sequenced by Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK). The nucleotide sequence obtained (deposited in GenBank under accession number GU830872) allowed us to resolve the genetic organization of the variant antibiotic resistance gene cluster, which consisted of the *groEL/int1* gene, followed by only 403 bp of the bla_{PSE-1} gene and by the IS*6100* element (Figure 1a). To confirm this genetic organization, we performed a Southern blot hybridization of genomic DNA cut either by HindIII or by XbaI and XhoI, and using as a probe the XbaI fragment of recombinant plasmid pSTF3, comprising nearly the entire In104 complex class 1 integron.[5] Southern blot profiles of the studied strain were clearly distinct from those of the control strain harbouring the classic SGI1 (Figure 1b). The sizes of the bands correlated with the genetic organization characterized previously by PCRs and sequencing. The cluster described in this study constitutes a new SGI1 variant and we propose to name it SGI1-T according to the nomenclature.[1]

The genetic structure described here could be explained by an intramolecular transposition of the IS*6100* element leading to the insertion of a second IS*6100* copy within bla_{PSE-1}. Subsequently, a single cross-over event between the two IS*6100* elements in the same orientation would have led to the deletion of the central region including a part of bla_{PSE-1}, *qacEΔ1sul1*, orf5 and orf6. IS*6100* has been described to transpose randomly by a replicative mode. The absence of direct repeats, as a result of the transposition event, is simply due to the intramolecular homologous recombination between the two IS elements, each with different direct repeat sequences. In *S. enterica* Typhimurium DT104, IS*6100*-mediated genetic rearrangements within SGI1 described previously[6,7] led to the formation of the SGI1-E variant[6] and to the deletion of the retron sequence and

© *The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org*

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org at AFSSA Derns on May 18, 2010

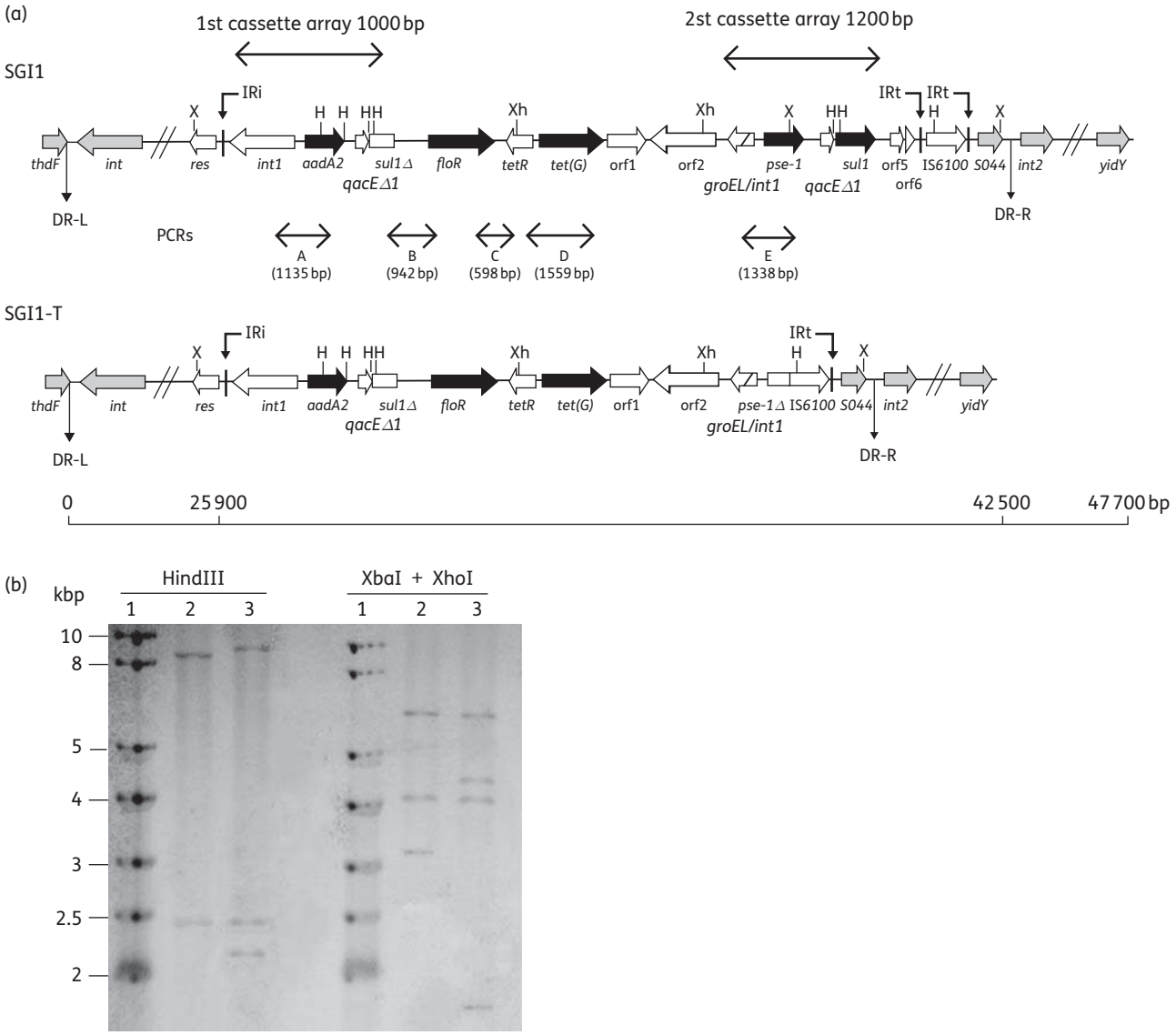


Figure 1. (a) Genetic organization of the classic antibiotic resistance gene cluster of SGI1 and the new SGI1-T variant. DR-L and DR-R are, respectively, the left and right direct repeats bracketing SGI1. IRi and IRt are 25 bp imperfect inverted repeats bracketing the complex class 1 integron. PCRs used to assess the genetic organization of the MDR region are indicated (PCRs A to E, and the cassette-array PCR). Restriction sites: X, XbaI; H, HindIII; and Xh, XhoI. (b) Southern blot hybridization with the pSTF3 probe of HindIII- and XbaI+XhoI-digested genomic DNAs of the serovar Typhimurium strain 72-21880-11 (lane 2) and the control strain serovar Typhimurium DT104 BN9181 (lane 3). Lane 1, DNA ladder.

neighbouring genes.[7] Thus, IS*6100* seems to give an additional recombination potential to the In104 integron, which may lead, in the future, to novel genetic rearrangements.

Funding

This research was supported by a contract in the 2007–08 programme between the French Food Safety Agency and the French National Institute of Agronomic Research.

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB *et al*. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* 2006; **8**: 1915–22.

2 Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A *et al*. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5725–32.

3 Doublet B, Praud K, Bertrand S *et al*. Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3745–54.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org at AFSSA Derns on May 18, 2010

4 Levings RS, Partridge SR, Djordjevic SP *et al*. SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 317–23.

5 Cloeckaert A, Sidi Boumedine K, Flaujac G *et al*. Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the *floR* gene in *S. enterica* serovar Agona. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1359–61.

6 Boyd D, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E *et al*. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1714–22.

7 Pilousova L, Matiasovicova J, Sisak F *et al*. Retron reverse transcriptase *(rrtT)* can be lost in multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 strains and influences virulence for mice. *Vet Microbiol* 2005; **111**: 191–7.

Downloaded from http://jac.oxfordjournals.org at AFSSA Derns on May 18, 2010

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE
Volume 00, Number 00, 2010
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/fpd.2009.0414

Original Article

Characterization of Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolated from Diseased Cattle in France (2002 to 2007)

Hayette Targant,[1] Cécile Ponsin,[1] Christiane Brunet,[1] Benoît Doublet,[2] Axel Cloeckaert,[2] Jean-Yves Madec,[1] and Danièle Meunier[1]

Abstract

We report here the results of the survey of antimicrobial resistance in 148 serotype Typhimurium strains isolated from cattle in France from 2002 to 2007 and displaying more than two antimicrobial resistances. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium of definitive phage type 104 strains that are commonly resistant to ampicillin–amoxicillin, chloramphenicol–florfenicol, streptomycin–spectinomycin, sulfonamides, and tetracycline (ACSSuT phenotype) harbored resistance genes clustered on a complex class 1 integron In104 of the *Salmonella* genomic island 1 (SGI1). In our isolates, the most common antimicrobial resistance pattern was ACSSuT (77.7%) or ACSSuT combined to additional resistances. SGI1 was detected in 143 strains and constituted thus the main structure involved in resistance to antimicrobials in these strains. In spite of the high recombination potential of In104, SGI1 variability was quite limited among these strains since only two SGI1 variants, SGI1-B and SGI1-C, were identified. One hundred and thirty-eight out of the 143 SGI1-positive isolates belonged to the DT104 complex. Pulsed-field gel electrophoresis profile A was the most prevalent in 135 SGI1-positive isolates, confirming the diffusion of the DT104 clone. However, changes in phages susceptibility have occurred in three serotype Typhimurium strains of phage type DT12, as they displayed the same pulsed-field gel electrophoresis profile as the SGI1-positive serotype Typhimurium DT104. No variant harboring an additional resistance gene was identified, but the risk of recombination between SGI1 and any other mobile structure carrying other antimicrobial resistance genes is still an issue in serotype Typhimurium.

Introduction

Multidrug-resistant (MDR) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium of definitive phage type 104 (hereafter called serotype Typhimurium DT104) was described for the first time in the United Kingdom in cattle in the mid-1980s (Ridley and Threlfall, 1998) and has been the cause of many outbreaks in humans and animals. This multidrug resistance has been shown to be conferred by the 43-kb *Salmonella* genomic island 1 (SGI1), which is an integrative mobilizable element located in the chromosome at the 3′ end of the *thdF* gene, also named *trmE* (Boyd *et al.*, 2001; Doublet *et al.*, 2005). SGI1 harbors a multidrug resistance region containing all antibiotic resistance genes, which is a complex class 1 integron, named In104 and located in the 3′ end of the island (Boyd *et al.*, 2001; Levings *et al.*, 2005). The In104 complex integron of SGI1 confers the common multidrug resistance profile to ampicillin, chloramphenicol–florfenicol, streptomycin–spectinomycin, sulfonamides, and tetracycline of serotype Typhimurium DT104 isolates (ACSSuT phenotype) (Boyd *et al.*, 2001; Cloeckaert and Schwarz, 2001; Mulvey *et al.*, 2006). The In104 complex integron possesses two cassette attachment sites (*attI1*). At the first *attI1* site of this complex integron, the cassette carries the *aadA2* gene, which confers resistance to streptomycin and spectinomycin, and downstream, a 3′ conserved segment (3′-CS) with a truncated *sul1* gene (*sul1*Δ). At the second *attI1* site, the cassette contains the *β*-lactamase gene bla_{PSE-1}, conferring resistance to ampicillin, and downstream, the 3′-CS comprises a complete *sul1* gene conferring resistance to sulfonamides. Flanked by the two cassettes are the *floR* gene, which confers cross-resistance to chloramphenicol and florfenicol, and the tetracycline resistance gene *tet*(G) (Boyd *et al.*, 2001). The In104 complex integron belongs to the In4 group of integrons, which includes an IS*6100* element downstream of the 3′-CS and is bound by 25-bp inverted repeats IRi and IRt (Partridge *et al.*, 2001a, 2001b).

SGI1 and variants classified in SGI1-A to SGI1-R have been described in a wide variety of *S. enterica* serotypes, including

[1]AFSSA, Bacterial Antimicrobial Resistance and Virulence Unit, Lyon, France.
[2]Animal Infectious Diseases and Veterinary Public Health (UR 1282), INRA, Nouzilly, France.

FPD-2009-0414-Targant_3P.3D 12/22/09 7:34am Page 2

Agona, Albany, Cerro, Derby, Dusseldorf, Emek, Haifa, Infantis, Kentucky, Kiambu, Meleagridis, Newport, Paratyphi B, Tallahassee, Typhimurium, and Virchow, as well as in *Proteus mirabilis* (Cloeckaert *et al.*, 2000; Boyd *et al.*, 2002, 2008; Meunier *et al.*, 2002; Doublet *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, 2007, 2008, 2009a, 2009c; Ebner *et al.*, 2004; Levings *et al.*, 2005, 2007; Ahmed *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2007; Djordjevic *et al.*, 2009). SGI1 variants were generated after chromosomal recombination events, by antibiotic resistance gene cassette replacement or by transposition of In4-type integrons and large IS*26*-composite transposons (Doublet *et al.*, 2008, 2009c), but in all cases were found integrated within the last 18 bp of the *thdF* gene (Boyd *et al.*, 2001, 2008). All these genetics events contribute to the diversification of the resistance phenotypes in *S. enterica*.

In this study, we characterized resistance genes implicated in MDR profiles of serotype Typhimurium isolates recovered from diseased cattle in France from 2002 to 2007. The detection and the characterization of SGI1 were performed to estimate the proportion and the variability of SGI1 in these isolates and to raise the question of SGI1 being still the major determinant of multidrug resistance in serotype Typhimurium.

Materials and Methods

Bacterial isolates

From 2002 to 2007, 255 serotype Typhimurium isolates recovered from diseased cattle were collected through the antimicrobial resistance monitoring scheme set up for diseased animals in France, Resapath network. Resapath network monitors resistance to antimicrobial agents in the main pathogenic bacteria isolated from diseased animals in France. The aims of the Resapath network are the detection of antimicrobial resistance emergence and the monitoring of its evolution over time and space. The network collects data and strains from voluntary veterinary diagnostic laboratories distributed in France and where identification of bacteria and antimicrobial susceptibility testing are performed upon veterinarians requests. During this period, serotype Typhimurium was the most prevalent serotype with 255 isolates recovered followed by serotypes Dublin (59 isolates), Mbandaka (32 isolates), Montevideo (19 isolates), and Anatum (15 isolates). The present study was conducted on the subset of 148 out of the 255 serotype Typhimurium isolates displaying resistance to at least two antimicrobial classes.

Control strains

Escherichia coli strain ATCC 25922 was used as a control in antimicrobial susceptibility testing by the disc diffusion method. *S. enterica* serotype Braenderup strain H9812 was used as a molecular size marker in the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) experiments. *S. enterica* serotype Typhimurium strain BN9181 carrying SGI1 was used as a control for polymerase chain reaction (PCR) and Southern blotting (Arcangioli *et al.*, 1999).

Serotyping and phage typing

Isolates were serotyped on the basis of somatic O and phase 1 and phase 2 flagellar antigens by agglutination tests with antisera (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the White–Kauffmann–Le Minor scheme (Popoff, 2001). Phage typing of serotype Typhimurium isolates was performed at the Pasteur Institute, Brussels, Belgium, according to (Threlfall and Frost, 1990).

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was determined by the disc diffusion method on Mueller–Hinton agar according to the guidelines of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (www.sfm.asso.fr) with discs containing amoxicillin (25 μg), amoxicillin–clavulanic acid (20–10 μg), chloramphenicol (30 μg), florfenicol (30 μg), streptomycin (10 IU), sulphonamides (200 μg), tetracycline (30 IU), trimethoprim (5 μg), kanamycin (30 IU), gentamicin (15 μg), apramycin (15 μg), nalidixic acid (30 μg), and enrofloxacin (5 μg). The strains were categorized with human and veterinary breakpoints defined in the guidelines according to the origin of the isolates.

Minimum inhibitory concentrations for nalidixic acid were performed using E-Test® strips (AES Chemunex, Bruz, France).

Detection of SGI1 by PCR mapping and Southern blot hybridization

The presence of SGI1 and its location in the chromosome of serotype Typhimurium isolates were detected by PCR with primers corresponding to the left and right junctions of SGI1 in the *S. enterica* chromosome (Table 1) (Boyd *et al.*, 2001). The presence of entire SGI1 was also confirmed by Southern blotting of *Xba*I-digested genomic DNA with the p1–9 probe. This probe corresponds to a 2 kb *Eco*RI central region of SGI1, comprising parts of the S023 and S024 open reading frames (Boyd *et al.*, 2001).

Detection of the complex class 1 integron In104 by PCR mapping and Southern blot hybridization

PCR mapping of the typical In104 integron associated with SGI1 was performed by using conditions and primers described previously (Table 1) (Cloeckaert *et al.*, 2000). The antibiotic resistance genes organization was also assessed by Southern blotting of genomic DNA cut by *Hind*III by using as a probe the *Xba*I fragment of recombinant plasmid pSTF3, comprising nearly the entire In104 complex class 1 integron (Cloeckaert *et al.*, 2000).

Pulsed-field gel electrophoresis

PFGE of genomic DNA digested with *Xba*I (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) was carried out with a CHEF-DRIII system (Bio-Rad, Richmond, CA). The running conditions were 6 V/cm at 14°C for 24 h with pulse times ramped from 10 to 60 s. *Xba*I-digested DNA of *S. enterica* serotype Braenderup H9812 was used as molecular size markers. BioNumerics 4.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgium) was used for image normalization and the construction of similarity matrices. Clustering was carried out by the unweighted pair group method with arithmetic averages based on the Dice similarity index.

Results

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing showed that the most common MDR type was resistance to amoxicillin,

Table 1. Oligonucleotide Primers Used in This Study

Target	*Primer designation*	*Oligonucleotide sequence (5′ → 3′)*	*PCR product size (bp)*
SGI1 left junction			
thdF	U7-L12	5′-ACACCTTGAGCAGGGCAAAG-3′	500
int	LJ-R1	5′-AGTTCTAAAGGTTCGTAGTCG-3′	
SGI1 right junction			
S044	104-RJ	5′-TGACGAGCTGAAGCGAATTG-3′	
int2	C9-L2	5′-AGCAAGTGTGCGTAATTTGG-3′	515
yidY	104-D	5′-ACCAGGGCAAAACTACACAG-3′	500
Class 1 integron			
	5′-CS	5′-GGCATCCAAGCAGCAAG-3′	Variable
	3′-CS	5′-AAGCAGACTTGACCTGA-3′	
floR	cml01	5′-TTTGGWCCGCTMTCRGAC-3′	494
	cml15	5′-SGAGAARAAGACGAAGAAG-3′	
PCR A			
intI1	int1	5′-GCTCTCGGGTAACATCAAGG-3′	1135
aadA2	aad	5′-GACCTACCAAGGCAACGCTA-3′	
PCR B			
*sul*Δ	sulTER	5′-AAGGATTTCCTGACCCTG-3′	942
floR	F3	5′-AAAGGAGCCATCAGCAGCAG-3′	
PCR C			
floR	F4	5′-TTCCTCACCTTCATCCTACC-3′	598
tetR	F6	5′-TTGGAACAGACGGCATGG-3′	
PCR D			
tetR	tetR	5′-GCCGTCCCGATAAGAGAGCA-3′	1559
tet(G)	tetA	5′-GAAGTTGCGAATGGTCTGCG-3′	
PCR E			
groEL-intI1	int2	5′-TTCTGGTCTTCGTTGATGCC-3′	1338
$bla_{\text{pse-1}}$	pse	5′-CATCATTTCGCTCTGCCATT-3′	
PCR F			
$bla_{\text{pse-1}}$	pse-L	5′-AATGGCAATCAGCGCTTCCC-3′	4748
dfrA10	dfrA10-B	5′-AACCAACACCACCAATGACA-3′	
PCR G			
IS*CR1*	Forf513	5′-GCAGCACTACCCAGCCTTCA-3′	2144
dfrA10	dfrA10-B	5′- AACCAACACCACCAATGACA-3′	
PCR H			
dfrA10	dfrA10-A	5′-TGTCATTGGTGGTGTTGGTT-3′	1269
sul1	Rsul1	5′-CGACACCGAGACCAATAGCG-3′	
PCR I			
dfrA10	dfrA10-A	5′-TGTCATTGGTGGTGTTGGTT-3′	3791
S044	MDR-B	5′-GAATCCGACAGCCAACGTTCC-3′	

PCR, polymerase chain reaction; SGI1, *Salmonella* genomic island 1; CS, conserved sequence; MDR, multidrug resistant.

chloramphenicol–florfenicol, streptomycin–spectinomycin, sulfonamides, and tetracycline (ACSSuT phenotype) found in 115 isolates (77.7%). R type ACSSuT associated with resistance to nalidixic acid (ACSSuTNal; minimum inhibitory concentration for nalidixic acid >256 mg/L) or trimethoprim (ACSSuTTmp) was found in 14 (9.4%) and 8 (5.4%) serotype Typhimurium isolates, respectively. Other R types found in these serotype Typhimurium isolates are described in Table 2.

Detection of SGI1

SGI1 was detected by PCR in 143 serotype Typhimurium isolates and was shown, as previously described, to be located between the *thdF* gene and a retron element (Table 2) (Boyd *et al.*, 2000, 2001). The presence and location of SGI1 in these 143 isolates was also confirmed by Southern blot hybridization of *Xba*I-digested genomic DNA with the p1–9 probe corresponding to a 2-kb *Eco*RI fragment comprising parts of the S023 and S024 open reading frames. Two *Xba*I fragments of 4- and 9-kb sizes hybridized with the probe in all SGI1-positive isolates (data not shown). It was concordant to the SGI1 nucleotide sequence (GenBank accession no. AF261825) and identical to what is observed in other SGI1-carrying *S. enterica* serovars (Boyd *et al.*, 2001; Mulvey *et al.*, 2006).

Characterization of resistance genes and class 1 integrons

Characterization of the typical antimicrobial resistance genes associated with the integron In104 was performed as described previously by PCR mapping (Table 1). One hundred and forty-one serotype Typhimurium isolates displaying the R type ACSSuT yielded fragments A to E and *floR* of sizes expected from the serotype Typhimurium DT104 control strain BN9181 harboring SGI1. Classical gene cassettes of 1.0 and 1.2 kb were found at the two attachment sites of In104 in these isolates. Among these 141 serotype Typhimurium isolates, 26 displayed the R type ACSSuT combined

Table 2. Characteristics of the Serotype Typhimurium Isolates Studied

Antimicrobial R type	n	*SGI1*	*Integron PCR size (kb)*	*Phage type*	*β-lactams resistance gene other than* bla_{PSE-1}
ACSSuT	115	SGI1	1.0, 1.2	104 (105), 104L (8), 104L/ad (1), ND (1)	bla_{TEM-1}(1)
ACSSuTNal	14	SGI1	1.0, 1.2	104(12), 104L(2)	bla_{TEM-1} (1)
ACSSuTTmp	8	SGI1	1.0, 1.2	12/ad (3), 104L(1), 104L/ad(4)	bla_{TEM-1} (2)
ACSSuTGm	2	SGI1	1.0, 1.2	NT	—
		SGI1-B	1.2	104L/ad	—
ACSSuTNalGm	1	SGI1	1.0, 1.2	NT	—
ACSSuTTmpGm	1	SGI1	1.0, 1.2	104L/ad	—
ACSSuTTmpK	1	SGI1	1.0, 1.2	104L/ad	—
ASSu	1	SGI1-C	1.0	104L/ad	bla_{TEM-1}
ASSuT	1	—	—	104L	bla_{TEM-1}
ASSuTmp	1	—	1.4	RDNC133	bla_{TEM-1}
AST	1	—	—	104L/ad	bla_{TEM-1}
SSuTTmp	2	—	—	29/ad, 208	—

ACSSuT, resistant to ampicillin–amoxicillin, chloramphenicol–florfenicol, streptomycin–spectinomycin, sulfonamides, and tetracycline; ND, not determined; NT, nontypeable; RDNC, reacts but not conform to the scheme.

with one or more additional resistances to nalidixic acid, gentamicin, or trimethoprim. Southern blotting hybridization of *Hind*III-digested genomic DNA with the pSTF3 probe showed that the organization of the integron In104 in these 26 isolates was the same as in serotype Typhimurium DT104 control strain BN9181. Thus, no insertion of genes conferring resistance to gentamicin or trimethoprim within the integron In104 was demonstrated, which suggests that these resistance genes were located elsewhere on the chromosome or on a plasmid.

In one of the serotype Typhimurium isolates displaying the R type ACSSuTGm, PCR amplification of classical gene cassettes using 5′-CS and 3′-CS primers yielded one fragment of 1.2 kb, whereas PCR A and PCR E, specific of the genes contained at the two attachment sites of In104, failed. Moreover, sequencing of the entire integron revealed the presence of the gene cassette bla_{PSE-1}. To assess the gene cassette array at the second *attI1* site, a PCR with the forward primer of PCR A, targeting the *intI1* gene, and the reverse primer of PCR E targeting the bla_{PSE-1} gene was performed. The positive result for this PCR indicated the presence in this isolate of a variant of SGI1, called SGI1-B, which has been shown to harbor a single complete integron with the bla_{PSE-1} gene and occurred after recombination between 5′-CS of SGI1. Southern blotting of *Hind*III-digested genomic DNA with the pSTF3 probe revealed two fragments of 2.0 and 4.0 kb, indicating that the entire antibiotic resistance gene cluster was not present in this isolate (data not shown).

As *tet*(G) seemed not to be located within the In104, PCRs were performed with primers specific for *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), and *tet*(E) corresponding to different tetracycline resistance genes mostly encountered in *Salmonella.* A positive result was obtained when primers specific for the *tet*(C) gene was used.

Florfenicol and chloramphenicol resistance was conferred by the *floR* gene in this isolate. Interestingly, no link between *floR*, *tet*(C), and the antibiotic resistance genes cluster was demonstrated by PCR mapping. Thus, to assess the presence of plasmid-borne *floR* and *tet*(C), mating experiments were carried out and antimicrobial susceptibility testing was performed on transconjugants, which all showed resistance to florfenicol and tetracycline associated with *floR* and *tet*(C) located on the same plasmid (data not shown).

One serotype Typhimurium isolate was resistant to amoxicillin, streptomycin–spectinomycin, and sulfonamides (R type ASSu). The PCR mapping results were only positive for fragment A specific for the *aadA2* gene cassette. This SGI1 variant containing a single *aadA2* gene cassette was previously characterized as SGI1-C (Boyd *et al.*, 2002). Resistance to *β*-lactams in this isolate was shown to be conferred by bla_{TEM-1}.

Resistance to *β*-lactams was mainly conferred by bla_{PSE-1} in serotype Typhimurium isolates harboring SGI1 or SGI1-B. In isolates in which SGI1 was absent or which harbored SGI1 without bla_{PSE-1}, resistance to *β*-lactams was conferred by bla_{TEM-1} (Table 2). The plasmid-mediated quinolone resistance *qnrA*, *B*, and *S* genes were absent from all the serotype Typhimurium isolates resistant to quinolones.

Relation between phage typing, PFGE, and SGI1

Phage type 104 or related phage types (DT104L and DT104L/ad) were found in 140 MDR serotype Typhimurium strains. The eight other serotype Typhimurium isolates belonged to phage types DT12/ad (3), DT29/ad (1), DT208 (1), and RNDC133 (1), or were not typeable (Fig. 1) (Table 2).

PFGE of *Xba*I-digested genomic DNA from the 148 serotype Typhimurium isolates generated 10 PFGE profiles (Fig. 1). PFGE profile A was the most prevalent and found in 135 SGI1 (or variants SGI1-B and -C)-positive isolates (91.2%). Among the 135 isolates displaying the profile A, 130 were of the phage type DT104 complex. Eight other SGI1-positive isolates of the DT104 complex displayed four different PFGE profiles (B, C, D, and E). These results confirmed that SGI1 is mainly encountered in the DT104 clone. Interestingly, in profile A, three serotype Typhimurium isolates harboring SGI1 belonged to phage type DT12/ad. Among the remaining isolates negative for SGI1, two were of the DT104 complex with specific PFGE profiles (H and I) and the other were of phage types DT29/ad, DT208, and RDNC133 and displayed also specific PFGE profiles (F, J, and G, respectively) (Fig. 1).

FPD-2009-0414-Targant_3P.3D 12/22/09 7:34am Page 5

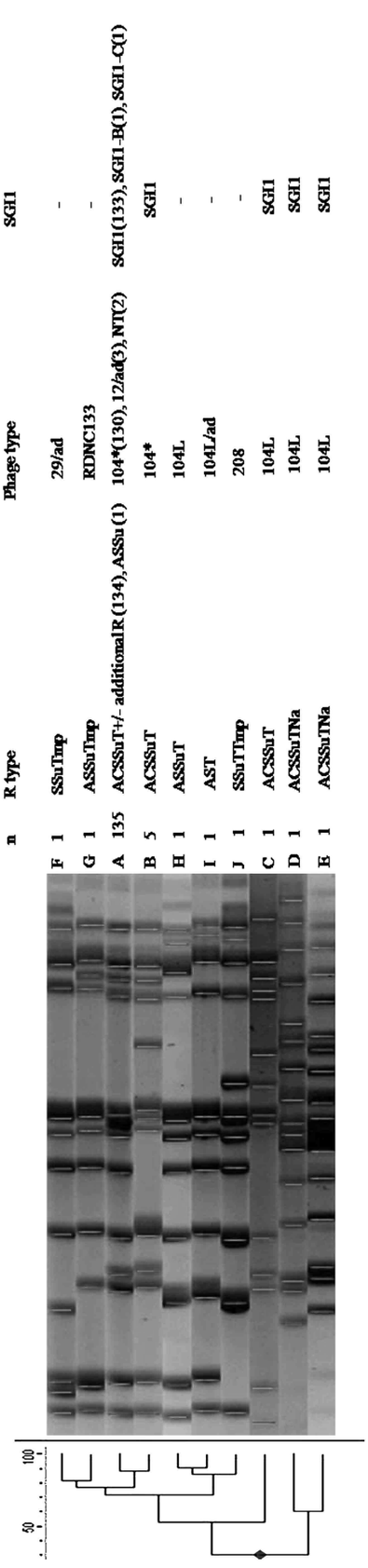


FIG. 1. Cluster analysis generated by BioNumerics of the *Xba*I pulsed-field gel electrophoresis of the 148 serotype Typhimurium isolates. Comparison was performed using the Dice coefficient and clustering was by the unweighted pair group method with arithmetic averages. The different pulsed-field gel electrophoresis profiles, number of isolates, R and phage types, and presence or absence of SGI1 are indicated. *DT104 and related phage types DT104L and DT104L/ad were regrouped as DT104 when the number of isolates is greater than 1. SGI1, *Salmonella* genomic island 1. A–J correspond to the different pulsed-field electrophoresis profiles.

Discussion

MDR serotype Typhimurium DT104 was described for the first time in the United Kingdom in cattle in the mid-1980s, and has increased dramatically in the United Kingdom as in other countries in the 1990s (Ridley and Threlfall, 1998). Multidrug resistance in serotype Typhimurium DT104 has been shown to be associated with the presence of SGI1 (Boyd *et al.*, 2001; Mulvey *et al.*, 2006). SGI1 is the first genomic island containing an MDR gene cluster identified in *S. enterica* and may have been an important trait in the worldwide epidemic of the MDR serotype Typhimurium DT104 clone. On the other hand, in France, the annual incidence of salmonellosis in cattle has decreased from about 6 herds to 1 herd per 1000 between 1996 and 2000 (Chazel *et al.*, 2005; Hendrikx *et al.*, 2005). Although serotype Typhimurium is the most prevalent serotype recovered, it declined specifically in cattle since 1996. However, MDR serotype Typhimurium isolates still remain encountered in diseased animals. Thus, in the present study, we intended to investigate to what extent SGI1 may still account for this multidrug resistance in serotype Typhimurium isolated from cattle by studying 148 serotype Typhimurium isolates collected from 2002 to 2007 and that were resistant to $\geq$2 different classes of antimicrobials.

SGI1 was detected in 143 out of the 148 serotype Typhimurium isolates studied. These isolates displayed an ACSSuT type (115 isolates) or an ACSSuT type combined with one or more additional resistances (27 isolates), with the exception of one last isolate of the ASSu phenotype. PCR mapping of antimicrobial resistance genes of the In104 confirmed that the classical SGI1 element was present in all but two isolates and constituted thus the main structure involved in the resistance to antimicrobials in MDR serotype Typhimurium isolated from cattle. The only two SGI1 variants that were found out in this study were of the SGI1-B and SGI1-C type, with the notable and still undescribed finding of an ACSSuT phenotype conferred by SGI1-B and plasmid-borne phenicols and tetracycline *floR* and *tet(C)* genes. Thus, SGI1 variability was extremely limited among the serotype Typhimurium isolates studied, what stands in partial contradiction with the high potential of recombination of In104 (Mulvey *et al.*, 2006). Also, as the remaining five isolates that did not harbor SGI1 were susceptible to florfenicol, this antimicrobial remains probably a good indicator for the presence of SGI1 in *S. enterica* isolates (Arcangioli *et al.*, 1999; Briggs and Fratamico, 1999; Boyd *et al.*, 2001, 2002).

Analysis of the phage typing results revealed that 138 (96.5%) out of the 143 isolates harboring SGI1 belonged to the DT104 complex (DT104 and closely related phage types, DT104L and DT104L/ad). Analysis of the distribution of PFGE profiles demonstrated that one profile was mostly prevalent and was encountered in 135 SGI1 positive out of the 148 MDR serotype Typhimurium isolates. Again, these results strongly demonstrate that the SGI1-carrying DT104 clone contributes still at first to the multidrug resistance of serotype Typhimurium strains isolated from cattle. Interestingly, 3 of the 135 SGI1 positive were of phage type DT12 and displayed a similar profile as the serotype Typhimurium DT104 strains positive for SGI1. SGI1 has previously been detected not only in MDR DT104 but also in related phage types DT120, U302, or DT12. In these phage types, the occurrence of R type ACSSuT may be explained by changes in phage susceptibility

FPD-2009-0414-Targant_3P.3D 12/22/09 7:34am Page 6

rather than by horizontal transfer of resistance genes (Lawson *et al.*, 2002).

Resistance to third-generation cephalosporins and quinolones/fluoroquinolones was also monitored in this study, as extended spectrum cephalosporins and ciprofloxacin are the drugs of choice for the treatment of *Salmonella* infections in humans. Until now, resistance to third-generation cephalosporins has been only sporadically described in *S. enterica* isolated from animals in France, and only from poultry, poultry products, or cockles (Weill *et al.*, 2004; Egorova *et al.*, 2008; Doublet *et al.*, 2009b). Also, high-level resistance to fluoroquinolones remains relatively uncommon in *S. enterica* (Baucheron *et al.*, 2002). However, the global incidence of quinolones resistance in *S. enterica* isolates from humans and food animals seems to increase with recent isolates showing decreased susceptibility to fluoroquinolones (Carrique-Mas *et al.*, 2008). Again in this study, resistance to third-generation cephalosporins or fluoroquinolones was not detected in the present panel of strains (data not shown).

In conclusion, almost two decades after the epidemic diffusion of the DT104 clone worldwide, multidrug resistance in serotype Typhimurium isolates from cattle was still mainly due to the resistance genes of SGI1 with the classical penta-resistance phenotype ACSSuT. In cattle and in contrast to what is observed in humans (Weill *et al.*, 2006), the DT104 clone seems to have undergone little changes over the years. However, in animals, the growing spread of mobile genes conferring resistance to third-generation cephalosporins in other *Enterobacteriaceae*, and in particular in *E. coli* (Meunier *et al.*, 2006; Girlich *et al.*, 2007; Madec *et al.*, 2008), raises the question of the ability of SGI1 to capture such genetic determinants. Should this occur, such a chromosomal support would probably confer additional selective advantages to their carriers and contribute to further enhance the animal reservoir of resistant foodborne pathogens such as *S. enterica*.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the veterinary laboratories that participate in RESAPATH network. This work was supported by a grant from the French Ministry of Agriculture (Direction Générale de l'Alimentation) and by the EU-funded network of excellence MedVetNet (work package WP21).

Disclosure Statement

No competing financial interest exist.

References

Ahmed AM, Hussein AI, and Shimamoto T. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. J Antimicrob Chemother 2007;59:184–190.

Arcangioli MA, Leroy-Setrin S, Martel JL, *et al*. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol Lett 1999;174:327–332.

Baucheron S, Imberechts H, Chaslus-Dancla E, *et al*. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT204. Microb Drug Resist 2002;8:281–289.

Boyd D, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E, *et al*. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1714–1722.

Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, *et al*. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J Bacteriol 2001;183:5725–5732.

Boyd DA, Peters GA, Ng LK, *et al*. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhymurium DT104. FEMS Microbiol Lett 2000;189:285–291.

Boyd DA, Shi X, Hu QH, *et al*. *Salmonella* genomic island 1 (SGI1), variant SGI1-I, and new variant SGI1-O in *Proteus mirabilis* clinical and food isolates from China. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:340–344.

Briggs CE and Fratamico PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:846–849.

Carrique-Mas JJ, Papadopoulou C, Evans SJ, *et al*. Trends in phage types and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from animals in Great Britain from 1990 to 2005. Vet Rec 2008;162:541–546.

Chazel M, Buret Y, Meunier D, *et al*. Les salmonelloses cliniques digestives des bovins en France: l'évolution de l'incidence annuelle et le bilan du R.E.S.S.A.B. Bulletin des GTV 2005;30:343–349. (In French.)

Chiu CH, Chen HL, Kao LS, *et al*. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene clusters in *Salmonella enterica* serovar Derby isolates from humans in Taiwan. J Antimicrob Chemother 2007;59:325–326.

Cloeckaert A and Schwarz S. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. Vet Res 2001;32:301–310.

Cloeckaert A, Sidi Boumedine K, Flaujac G, *et al*. Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the *floR* gene in *S. enterica* serovar agona. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1359–1361.

Djordjevic SP, Cain AK, Evershed NJ, *et al*. Emergence and evolution of multiply antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B D-tartrate-utilizing strains containing SGI1. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:2319–2326.

Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, *et al*. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. Mol Microbiol 2005;55:1911–1924.

Doublet B, Butaye P, Imberechts H, *et al*. *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance gene clusters in *Salmonella enterica* serovar Agona isolated in Belgium in 1992 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004a;48:2510–2517.

Doublet B, Chu C, Chiu CH, *et al*. Truncated *tni* module adjacent to the complex integron of *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella enterica* serovar Virchow. Antimicrob Agents Chemother 2009a;53:824–827.

Doublet B, Golding GR, Mulvey MR, *et al*. Potential integration sites of the *Salmonella* genomic island 1 in *Proteus mirabili*s and other bacteria. J Antimicrob Chemother 2007;51:1872–1875.

Doublet B, Granier SA, Robin F, *et al*. Novel plasmid-encoded ceftazidime-hydrolyzing CTX-M-53 extended-spectrum beta-lactamase from *Salmonella enterica* serotypes Westhampton and Senftenberg. Antimicrob Agents Chemother 2009b;53:1944–1951.

FPD-2009-0414-Targant_3P.3D 12/22/09 7:34am Page 7

Doublet B, Lailler R, Meunier D, *et al*. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. Emerg Infect Dis 2003;9:585–591.

Doublet B, Praud K, Bertrand S, *et al*. Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3745–3754.

Doublet B, Praud K, Weill FX, *et al*. Association of IS*26*-composite transposons and complex In4-type integrons generates novel multidrug resistance loci in *Salmonella* genomic island 1. J Antimicrob Chemother 2009c;63:282–289.

Doublet B, Weill FX, Fabre L, *et al*. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3′-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac*(3)-*Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. Antimicrob Agents Chemother 2004b;48:3806–3812.

Ebner P, Garner K, and Mathew A. Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island SGI1 in *Salmonella enterica* var. Meleagridis. J Antimicrob Chemother 2004;53:1004–1009.

Egorova S, Timinouni M, Demartin M, *et al*. Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport, France. Emerg Infect Dis 2008;14:954–957.

Girlich D, Poirel L, Carattoli A, *et al*. Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. Appl Environ Microbiol 2007;73:4681–4685.

Hendrikx P, Chazel M, Buret Y, *et al*. Development of performance indicators for the bovine clinical salmonellosis surveillance network in France. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2005;52:465–475.

Lawson AJ, Dassama MU, Ward LR, *et al*. Multiply resistant (MR) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 12 and DT 120: a case of MR DT 104 in disguise? Emerg Infect Dis 2002; 8:434–436.

Levings RS, Lightfoot D, Partridge SR, *et al*. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. J Bacteriol 2005;187:4401–4409.

Levings RS, Partridge SR, Djordjevic SP, *et al*. SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:317–323.

Madec JY, Lazizzera C, Chatre P, *et al*. Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France. J Clin Microbiol 2008;46:1566–1567.

Meunier D, Boyd D, Mulvey MR, *et al*. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 antibiotic resistance genomic island I in serotype Paratyphi B. Emerg Infect Dis 2002;8: 430–433.

Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, *et al*. CTX-M-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. Int J Antimicrob Agents 2006;28:402–407.

Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, *et al*. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. Microbes Infect 2006;8:1915–1922.

Partridge SR, Brown HJ, Stokes HW, *et al*. Transposons Tn*1696* and Tn*21* and their integrons In4 and In2 have independent origins. Antimicrob Agents Chemother 2001a;45:1263–1270.

Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW, *et al*. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn*1696*. Antimicrob Agents Chemother 2001b;45:3014–3020.

Popoff MY. *Antigenic Formulas of the* Salmonella *Serovars*, 8th edition. Paris, France: WHO Collaborating Center for the Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, 2001.

Ridley A and Threlfall EJ. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella* Typhimurium DT104. Microb Drug Resist 1998;4:113–118.

Threlfall EJ and Frost JA. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. J Appl Bacteriol 1990;68:5–16.

Weill FX, Guesnier F, Guibert V, *et al*. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). J Clin Microbiol 2006;44:700–708.

Weill FX, Lailler R, Praud K, *et al*. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. J Clin Microbiol 2004;42:5767–5773.

Address correspondence to:
Danièle Meunier, Ph.D.
AFSSA
Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes
31 Ave. Tony Garnier
Lyon 69364
France

E-mail: d.meunier@afssa.fr

Journal of Microbiological Methods 75 (2008) 359–361

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains

Benoît Doublet [a,*], Gregory Douard [a], Hayette Targant [b], Danièle Meunier [b], Jean-Yves Madec [b], Axel Cloeckaert [a]

[a] INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly, 37380, France
[b] AFSSA, Unité de Bactériologie Bovine et Sécurité des Viandes, Lyon, 69364, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 February 2008
Received in revised form 4 June 2008
Accepted 17 June 2008
Available online 21 June 2008

Keywords:
Lambda red recombinase
FLP recombinase
Multidrug-resistant *Salmonella*
SGI1

ABSTRACT

The Red recombinase system of bacteriophage Lambda has been used to inactivate chromosomal genes in bacteria using PCR products. In this study, we describe the replacement of the ampicillin resistance marker of helper plasmids pKD46 and pCP20 by a gentamicin resistance gene to disrupt chromosomal genes and then to eliminate FRT flanked resistance gene in multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* strains.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Over the last few years, bacteriophage-encoded recombinases have been used for engineering homologous recombination in the chromosomes of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and other bacteria (Datsenko and Wanner, 2000; Uzzau et al., 2001). The gene replacement method developed by Datsenko and Wanner was initially used for the disruption of chromosomal genes using linear PCR products which provide the homology with the targeted genes (Datsenko and Wanner, 2000). Modifications of the gene disruption method have been developed for epitope tagging of chromosomal genes and phage genes, single transcriptional and translational fusions in the chromosome of *E. coli* or *S. enterica* and also for the construction of vaccine carrier of *S.* Typhimurium strains (Uzzau et al., 2001; Ellermeier et al., 2002; Husseiny and Hensel, 2005; Serra-Moreno et al., 2006). All these Red recombinase approaches require the phage λ Red recombinase expression in the bacterial strain for an efficient recombination between the targeted gene and a linear PCR product. This PCR product may contain different antibiotic resistance genes flanked by FLP recognition target (FRT) sites. Thus, mutants of the targeted gene are isolated as antibiotic-resistant colonies. Then, the elimination of the resistance gene can be mediated by the FLP recombinase which acts on the FRT sites (Datsenko and Wanner, 2000). Expression of the λ Red recombinase or FLP recombinase is required from helper plasmids such as pKD46 and pCP20, respectively, which are temperature-sensitive and thus can be easily eliminated. However, the introduction of the pKD46 helper plasmid in bacterial strains requires to be realized on ampicillin-susceptible strains because pKD46 carries an ampicillin resistance marker (GenBank accession number AY048746). The pCP20 helper plasmid, which expresses the FLP recombinase, carries ampicillin and chloramphenicol resistance markers and thus, its introduction also requires a chloramphenicol or ampicillin-susceptible strain (Cherepanov and Wackerneagel, 1995; Datsenko and Wanner, 2000).

The 43-kb *Salmonella* Genomic island 1 (SGI1) is a chromosomally integrative mobilizable element that was originally identified in epidemic multidrug-resistant *S. enterica* serovar Typhimurium phage type DT104 strains (Boyd et al., 2001; for review, Mulvey et al., 2006). SGI1 contains an antibiotic resistance gene cluster conferring resistance to ampicillin (Ap), chloramphenicol (Cm), florfenicol (Ff), streptomycin (Sm), spectinomycin (Sp), sulfonamides (Su), and tetracycline (Tc) (Boyd et al., 2001; Mulvey et al., 2006). Since the identification of SGI1 in *S.* Typhimurium DT104, variant SGI1 antibiotic resistance gene clusters have been described in a wide variety of *S. enterica* serovars and thus conferred various antibiotic resistance phenotypes (Mulvey et al., 2006). Few recent studies regarding the putative role of SGI1 in virulence revealed that multidrug-resistant *Salmonella* spp. possessing SGI1 presented a hypervirulence phenotype in different invasion and infection models compared to non-resistant strains (Mulvey et al., 2006).

In this study, we describe the modification of the antibiotic resistance markers of helper plasmids pKD46 and pCP20 to construct a

* Corresponding author. Tel.: +33 2 47 42 72 95; fax: +33 2 47 42 77 74.
E-mail address: Benoit.Doublet@tours.inra.fr (B. Doublet).

0167-7012/$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mimet.2008.06.010

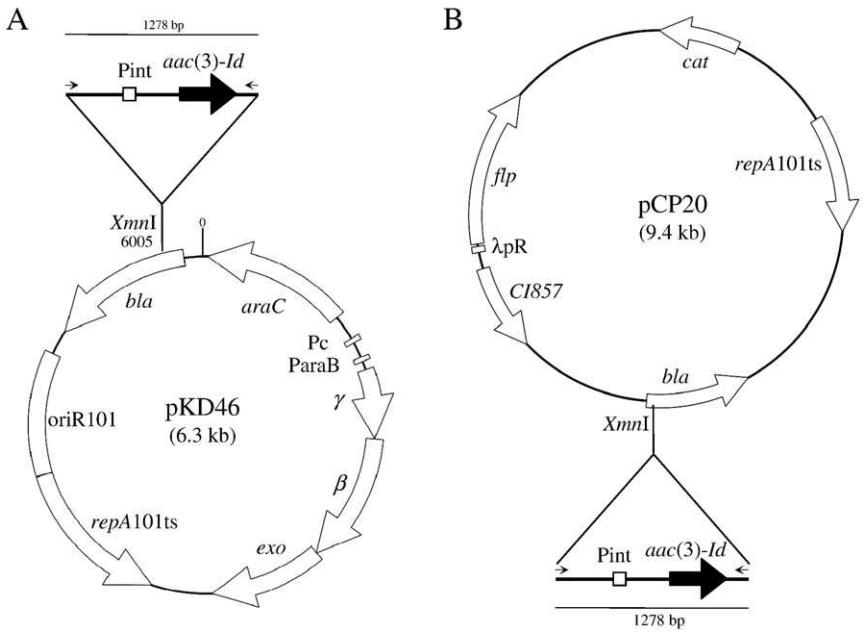


Fig. 1. Schematic view of λ Red recombinase expression plasmid pKD46 (A), Flp recombinase expression plasmid pCP20 (B), and the 1278-bp PCR fragment containing the gentamicin resistance gene, *aac*(3)-*Id*. Promoters Pint, Pc, ParaB, and λpR are represented by white boxes. The single XmnI restriction site in the ampicillin resistance gene, *bla*, is indicated. Small black arrows represent primers int1 and aacR to amplify the *aac*(3)-*Id* resistance gene and the promotor (Pint) which transcribes cassette-associated genes in class 1 integron. (A). The λ Red system includes three genes: γ, β, and *exo*. (B). The *flp* recombinase gene is under the control of the λpR promoter and the temperature-sensitive repressor cI857 of the phage λ;

S. Typhimurium DT104 mutant strain lacking SGI1 to demonstrate in future animal experimentation its implication in the pathogenicity of multidrug-resistant *S.* Typhimurium DT104 strains. This modification of helper plasmids pKD46 and pCP20 will be useful to inactivate SGI1 ORFs suspected to be implicated in the enhancement of virulence. We chose to introduce a gentamicin resistance gene, *aac*(3)-*Id*, also called *aacC5*, within the *bla* resistance gene of pKD46 and pCP20. The XmnI enzyme, which possesses a single site within the *bla* resistance gene, was used to linearize these plasmids (Fig. 1) (GenBank accession number AY048746) (Cherepanov and Wackerneagel, 1995; Datsenko and Wanner, 2000). The gentamicin resistance gene, *aac*(3)-*Id* and the promoter region of class 1 integron was amplified by PCR using the template plasmid pBD12 and primers intI1 and aacR (Table 1, Fig. 1) (Doublet et al., 2004). This blunt-end PCR product of 1278 bp in size was ligated into the linearized plasmids pKD46 (Fig. 1) or pCP20 (not shown). The resulting plasmids were named pKD46-Gm and pCP20-Gm.

Deletion of the entire SGI1 was performed in *S.* Typhimurium DT104 strain 1948SA96 by use of the one-step chromosomal gene inactivation technique (Datsenko and Wanner, 2000). Briefly, the kanamycin resistance gene *kan* flanked by FRT sites was amplified by PCR using the template plasmid pKD4 and hybrid primers (Table 1). These primers, RecSGI1-F and RecSGI1-R, were synthesized with 20 nucleotides of priming sites of pKD4 and with 50 nucleotides from each side of SGI1 (GenBank accession number AF261825). The 1.6 kb PCR product was purified and electroporated into the *S.* Typhimurium DT104 strain 1948SA96 in which the λ Red recombinase expression plasmid pKD46-Gm was introduced. Homologous recombination between the PCR product and the genomic DNA resulted in the deletion of the 43 kb SGI1 and in its replacement by the *kan* cassette. This mutant strain was named 1948SA96ΔSGI1::*kan*. After primary selection, mutant colonies were grown at 37 °C and/or 43 °C for loss of the helper plasmid pKD46-Gm. Different PCRs were used to show that the SGI1 mutants had the correct structure using primers k2, kt (*kan*), and U7L12, C9L2 flanking SGI1 in the chromosome (Table 1). PCR products of the expected sizes were obtained using target-flanked primers and *kan*-specific primers. The loss of the antibiotic resistance phenotype conferred by SGI1 was

Table 1
Plasmids and primers used in the present study

Plasmid or primer Name	Resistance profile and relevant characteristics or sequence (5′ to 3′)	Reference
pKD46	Ap, λ Red recombinase expression	Datsenko and Wanner (2000)
pCP20	ApCm, FLP recombinase expression	Datsenko and Wanner (2000)
pKD4	ApKm, *kan* cassette template	Datsenko and Wanner (2000)
pBD12	ApGmKm, *aac*(3)-*Id* gene template	Doublet et al. (2004)
pKD46-Gm	Gm, λ Red recombinase expression	This study
pCP20-Gm	CmGm, FLP recombinase expression	This study
int1	GCTCTCGGGTAACATCAAGG	Doublet et al. (2004)
aacR	GCGGGCACTTTTTCACTCAT	Doublet et al. (2004)
RecSGI1-F	CCGACGACCTGCTGGGACGGATTTTCTCCAGCTTCTGTATTGGGAAGTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This study
RecSGI1-R	GGCAGTTAATGCGGGTTAGTGAACGTTCACTGACGAGGGTGGACTAAAACCATATGAATATCCTCCTTAG	This study
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Datsenko and Wanner (2000)
Kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Datsenko and Wanner (2000)
U7-L12	ACACCTTGAGCAGGGCAAG	Boyd et al. (2001)
C9-L2	AGCAAGTGTGCGTAATTTGG	Boyd et al. (2001)

also confirmed by the antibiotic disc diffusion method. All SGI1 mutants tested were only resistant to kanamycin.

To eliminate the *kan* cassette, the kanamycin-resistant mutant strain 1948SA96ΔSGI1::*kan* was transformed with the FLP recombinase expression plasmid pCP20-Gm, and gentamicin-resistant transformants were selected at 30 °C. After culture at 37 °C and/or 43 °C, a large majority of transformants lost the FRT flanked *kan* gene and also the FLP helper plasmid pCP20-Gm and thus, were fully antibiotic susceptible. The resulting mutants named 1948SA96ΔSGI1 were tested by PCR using primers flanking the deleted region and revealed that all harboured a 85 nucleotide scar in place of SGI1 (Boyd et al., 2001; Datsenko and Wanner, 2000). The efficiency of the one-step chromosomal inactivation technique using plasmids pKD46-Gm and pCP20-Gm was comparable to the use of the original helper plasmids pKD46 and pCP20 (data not shown) (Datsenko and Wanner, 2000). The modification of the helper plasmids of the one-step chromosomal gene inactivation method of Datsenko and Wanner appeared useful to generate deletions in multidrug-resistant *S. enterica* field strains especially for strains resistant to ampicillin and chloramphenicol. Moreover, this technique has been applied to delete a large genomic island of 43 kb in size and should be useful to create large chromosomal deletions. However, to adapt it to multidrug-resistant strains that are gentamicin-resistant, the same modifications of the λ Red recombinase and FLP recombinase expression plasmids pKD46 and pCP20, respectively, may be realized with another resistance marker following the same methodology.

Acknowledgments

This study was supported by public funds from the French National Institute of Agronomic Research and French Food Safety Agency.

References

Boyd, D.A., Peters, G.A., Cloeckaert, A., Sidi-Boumedine, K., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., Mulvey, M.R., 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kb genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J. Bacteriol. 83, 5725–5732.

Cherepanov, P.P., Wackerneagel, W., 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene 158, 9–14.

Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 6640–6645.

Doublet, B., Weill, F.X., Fabre, L., Chaslus-Dancla, E., Cloeckaert, A., 2004. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3′-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac*(3)-*Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 3806–3812.

Ellermeier, C.D., Janakiraman, A., Slauch, J.M., 2002. Construction of targeted single copy lac fusions using λ Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. Gene 290, 153–161.

Husseiny, M.I., Hensel, M., 2005. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine carrier strains. Infect. Immun. 73, 1598–1605.

Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B., Cloeckaert, A., 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. Microbes Infect. 8, 1915–1922.

Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J.P., Jofre, J., Muniesa, M., 2006. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. BMC Mol. Biol. 7, 31.

Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., Bossi, L., 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 15264–15269.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2006) **58**, 13–17
doi:10.1093/jac/dkl174
Advance Access publication 2 May 2006

JAC

Plasmid-mediated florfenicol resistance in *Pasteurella trehalosi*

Corinna Kehrenberg[1]†, Danièle Meunier[2]†, Hayette Targant[2], Axel Cloeckaert[3], Stefan Schwarz[1]* and Jean-Yves Madec[2]

[1]Institut für Tierzucht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Höltystr. 10, 31535 Neustadt-Mariensee, Germany; [2]Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 69007 Lyon, France; [3]Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Plasticité Génomique, Biodiversité, Antibiorésistance UR1282, 37380 Nouzilly, France

Received 7 February 2006; returned 22 March 2006; revised 4 April 2006; accepted 7 April 2006

***Objectives*: A florfenicol-resistant *Pasteurella trehalosi* isolate from a calf was investigated for the presence and the location of the gene *floR*.**

***Methods*: The *P. trehalosi* isolate 13698 was investigated for its *in vitro* susceptibility to antimicrobial agents and its plasmid content. A 14.9 kb plasmid, designated pCCK13698, was identified by transformation into *Pasteurella multocida* to mediate resistance to florfenicol, chloramphenicol and sulphonamides. The plasmid was sequenced completely and analysed for its structure and organization.**

***Results*: Plasmid pCCK13698 exhibited extended similarity to plasmid pHS-Rec from *Haemophilus parasuis* including the region carrying the *parA*, *repB*, *rec* and *int* genes. Moreover, it revealed similarities to plasmid RSF1010 in the parts covering the *mobC* and *repA-repC* genes and to plasmid pMVSCS1 in the parts covering the *sul2-catA3-strA* gene cluster. Moreover, the *floR* gene area corresponded to that of transposon Tn*floR*. In addition, two complete insertion sequences were detected that were highly similar to IS*1593* from *Mannheimia haemolytica* and IS*26* from Enterobacteriaceae. Several potential recombination sites were identified that might explain the development of plasmid pCCK13698 by recombination events.**

***Conclusions*: The results of this study showed that in the bovine pathogen *P. trehalosi*, *floR*-mediated resistance to chloramphenicol and florfenicol was associated with a plasmid, which also carried functionally active genes for resistance to sulphonamides (*sul2*) and chloramphenicol (*catA3*). This is to the best of our knowledge the first report of resistance genes in *P. trehalosi* and only the second report of the presence of a florfenicol-resistance gene in target bacteria of the family Pasteurellaceae.**

Keywords: *floR* gene, respiratory tract pathogens, antimicrobial resistance, gene transfer, recombination, insertion sequences

Introduction

Relatively few novel antimicrobial agents have been approved for veterinary use during recent years. One of them, the fluorinated chloramphenicol derivative florfenicol, was licensed in 1995 and 2000 for the control of respiratory pathogens from cattle and pigs, respectively.[1] A drug-specific monitoring programme in Germany that aimed at determining MICs of florfenicol among bovine (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*) and porcine respiratory tract pathogens (*P. multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*) revealed that virtually all target bacteria were florfenicol-susceptible and that their MIC_{50} and MIC_{90} values have remained stable over the past decade.[2] Recently, the first florfenicol-resistant bovine *P. multocida* isolate from the UK carrying the florfenicol resistance gene *floR* on a plasmid has been described.[3]

The gene *floR* codes for a membrane-associated efflux protein of the major facilitator superfamily and specifically exports phenicols from the bacterial cell.[4] This gene was previously detected as part of the *Salmonella* genomic island 1 associated multiresistance gene cluster, but was also detected in various Gram-negative enteric bacteria on plasmids or in the chromosomal DNA.[1]

*Corresponding author. Tel: +49-5034-871-241; Fax: +49-5034-871-246; E-mail: stefan.schwarz@fal.de
†These authors contributed equally to this work.

© The Author 2006. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

In 2005, the *floR* gene was identified to be part of the small non-conjugative transposon Tn*floR*.[5]

In contrast to *P. multocida*, little is known about antimicrobial resistance in other *Pasteurella* species.[6] This applies in particular to *Pasteurella trehalosi*. Originally described as biotype T of *Pasteurella haemolytica*, *P. trehalosi* was recognized as a separate species in 1990.[7] *P. trehalosi* is mainly a pathogen of sheep where it causes septicaemia in older lambs.[6] It has also been isolated from other ruminants including goats,[8] bisons[9] and cattle.[10] In the present study, we identified the first florfenicol-resistant bovine *P. trehalosi* isolate and investigated the genetic basis of this resistance trait and the localization of the corresponding resistance gene.

Materials and methods

Bacterial strain and species identification

The *P. trehalosi* isolate 13698 was obtained from the lung of a calf. The clinical signs were reported as respiratory disease. The strain was collected in France through the RESAPATH network. For species assignment, biochemical tests[11] were backed up by 16S rDNA sequencing. The latter approach was performed at the DSMZ, the German National Resource Centre for Biological Material in Braunschweig, Germany.

Antimicrobial susceptibility testing

In vitro susceptibility testing was performed by disc diffusion with discs containing ampicillin (10 μg), chloramphenicol (30 μg), enrofloxacin (5 μg), florfenicol (30 μg), gentamicin (10 μg), kanamycin (30 μg), neomycin (30 μg), spectinomycin (100 μg), streptomycin (10 μg), sulfamethoxazole (300 μg), tetracycline (30 μg) or trimethoprim (5 μg). MICs of florfenicol, chloramphenicol and sulphonamides were determined by broth macrodilution according to the NCCLS document M31-A2. The transformant *P. multocida* P4000::pCCK13698 was investigated for chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity by a colorimetric CAT assay.[12] The chloramphenicol-susceptible recipient strain *P. multocida* P4000 served as a negative control.

DNA techniques

PCR detection of florfenicol, chloramphenicol and sulphonamide resistance genes followed previously described protocols and primers.[4,13] Plasmid preparation by alkaline lysis and transformation experiments (heat-shock transformation into $CaCl_2$-treated competent cells or electrotransformation) into *Escherichia coli* recipient strains JM109, JM110, JM101, HB101 and C600 as well as *P. multocida* strain P4000 were conducted as described previously.[13,14] Transformants were selected on Luria–Bertani agar or sheep blood agar supplemented with either chloramphenicol (15 mg/L) or florfenicol (10 mg/L). Plasmid DNA obtained from the *P. multocida* transformants was subjected to restriction mapping; *Ssp*I fragments were cloned into pCR-Blunt® II-TOPO (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) and transformed into *E. coli* recipient strain TOP10. Sequence analysis by the dideoxy chain termination method (MWG Biotech, Martinsried, Germany) was started with the M13 reverse and forward primers and completed with primers derived from sequences obtained with the aforementioned standard primers. Sequence comparisons were performed with the BLAST programs blastn and blastp (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/; last accessed 29 January 2006) and with the ORF finder program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html; last accessed 29 January 2006).[15] The nucleotide sequence of plasmid pCCK13698 has been deposited in the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) database under accession number AM183225.

Results and discussion

Identification of plasmid pCCK13698

P. trehalosi 13698 carried a plasmid of ~15 kb, designated pCCK13698, which mediated resistance to chloramphenicol, florfenicol and sulphonamides when transferred into the *P. multocida* recipient strain P4000. No transformants were obtained in repeated transformation experiments with any of the *E. coli* recipient strains used, suggesting that this plasmid does not replicate in *E. coli*, but in *Pasteurella* hosts. The MICs for the original *P. trehalosi* strain and the *P. multocida* P4000::pCCK13698 transformant of florfenicol, chloramphenicol and sulphonamides were 16, 32 and 512 mg/L, respectively. PCR analysis of the transformant indicated the presence of not only the chloramphenicol-florfenicol resistance gene *floR*, but also the chloramphenicol acetyltransferase gene *catA3* and the sulphonamide resistance gene *sul2*. Because of the comparatively low MIC of chloramphenicol, we performed a CAT assay that showed a >20-fold higher deacetylation rate of acetyl-CoA in the cell-free lysates of *P. multocida* P4000::pCCK13698 as compared with the plasmid-free recipient strain *P. multocida* P4000 and hence confirmed pCCK13698-based CAT activity. The reason for the low MIC of chloramphenicol in the presence of two functionally active chloramphenicol resistance genes, *catA3* and *floR*, remains to be answered.

For a better characterization of the florfenicol resistance plasmid from *P. trehalosi* and a structural comparison with the *floR*-carrying plasmid pCCK381, previously identified in *P. multocida*,[3] plasmid pCCK13698 was sequenced completely. Sequence analysis revealed a total plasmid size of 14 969 bp. A map of plasmid pCCK13698 is shown in Figure 1.

Structure and organization of plasmid pCCK13698

The initial 635 bp of plasmid pCCK13698 as presented in Figure 1 consists of small segments that exhibited similarity to plasmid pCCK381[3] (positions 1–225) and to the *mobC* gene region of plasmid RSF1010[16] (positions 169–635). The RSF1010-like part ended at a 96 bp sequence that was identical to an internal segment of the transposase reading frames of IS*1592* and IS*1593*, the latter of which is an insertion sequence from *M. haemolytica* (EMBL database accession no. AJ439064). A large part of plasmid pCCK13698, comprising 6770 bp (positions 731–7500), corresponded closely (99.5% identity) to plasmid pHS-Rec from *Haemophilus parasuis*.[17] This segment included the genes *par*A coding for a 207-amino-acid partition protein, *rec* coding for a 255-amino-acid recombinase protein, *orfX* coding for a 168-amino-acid hypothetical protein of not further specified function, *repB* coding for a 372-amino-acid plasmid replication protein and *int* coding for a 261-amino-acid integrase protein (Figure 1). Immediately after the pHS-Rec homologous part, a complete copy of an IS*1593*-like insertion sequence was detected (positions 7497–8527). This insertion sequence, designated IS*1592*, was 1031 bp in size, had perfect 20 bp inverted repeated sequences at its termini and coded for a transposase protein of 294 amino acids that differed by three amino acid exchanges from that of IS*1593* from *M. haemolytica*. Further downstream of the IS*1592* element, a 2812 bp RSF1010-like

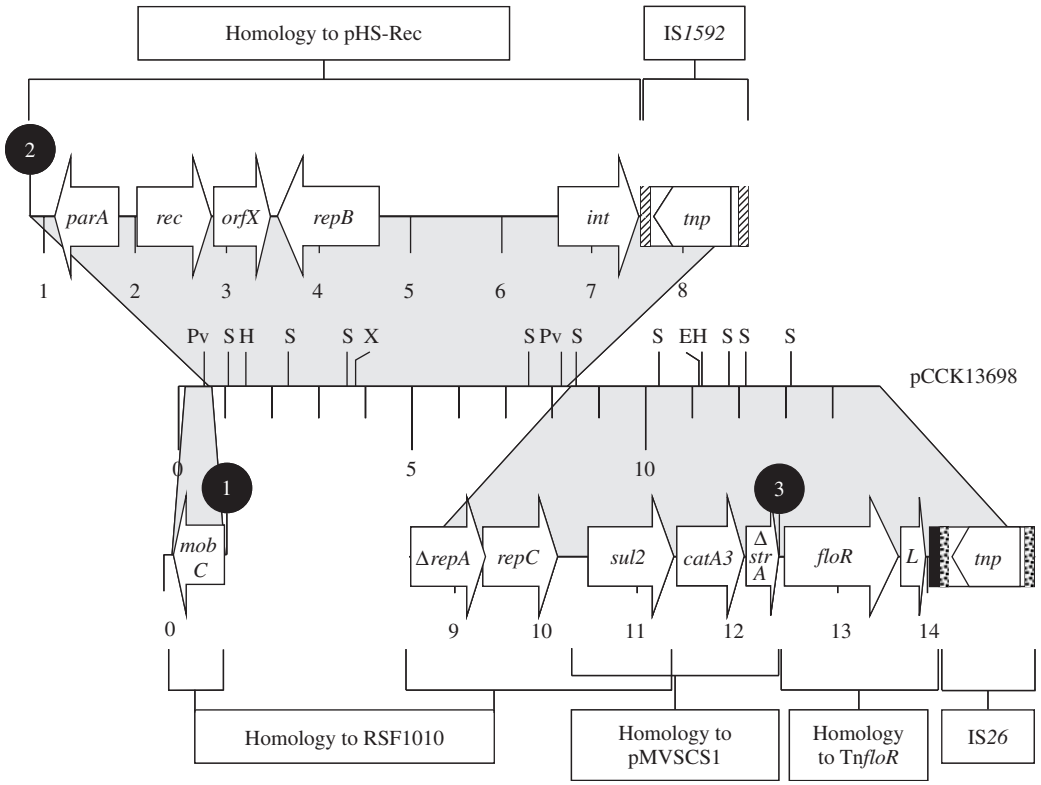


Figure 1. Schematic presentation of plasmid pCCK13698 (accession no. AM183225). A distance scale in kb is shown below the restriction map in the middle. The reading frames are presented as arrows in more detail either above or below the map with the arrowhead indicating the direction of transcription (*repA*, *repB*, *repC*: plasmid replication; *tnp*: transposition; *mobC*: mobilization; *rec*: recombination functions; *int*: integration functions; *parA*: DNA partition; *orfX*: unknown function; *sul2*: sulphonamide resistance; *catA3*: chloramphenicol resistance; *floR*: chloramphenicol-florfenicol resistance; *strA*: streptomycin resistance). The reading frame marked as L indicates the *lysR*-like transcriptional regulator, and the black box downstream of this reading frame indicates the 5′ end of the Tn*floR*-associated transposase reading frame. The Δ symbol indicates a truncated gene. Restriction sites are abbreviated as follows: E (*Eco*RI), H (*Hpa*I), Pv (*Pvu*II), S (*Ssp*I) and X (*Xba*I). Areas of >99% sequence identity to plasmids pHS-Rec, RSF1010 and pMVSCS1; to insertion sequences IS*1592*/IS*1593* and IS*26*; and to transposon Tn*floR* are indicated. The black circles with numbers 1–3 refer to the potential recombination sites 1–3 shown in Figure 2.

segment (positions 8526–11 337) was detected. It included a truncated Δ*repA* gene and a complete *repC* gene, which represent part of the *rep* gene area of the broad-host-range plasmid RSF1010, and an RSF1010-associated *sul2* gene.[16] The *sul2* gene, which codes for a 272-amino-acid sulphonamide-resistant dihydropteroate synthase, was followed by a *catA3* gene coding for a 213-amino-acid CAT and a largely truncated, functionally inactive *strA* gene coding for a streptomycin phosphotransferase. Only the initial 73 codons of the *strA* reading frame were present in plasmid pCCK13698. The 1831 bp segment (positions 10 475–12 305), comprising the genes *sul2*, *catA3* and Δ*strA*, showed 99.7% identity to the multiresistance gene cluster previously identified on plasmid pMVSCS1 from *Mannheimia varigena*.[18] The Δ*strA* gene was followed by a 1801 bp segment (positions 12 306–14 149) that exhibited 99.7% identity to the sequence of Tn*floR*.[5] It contained the complete gene *floR* coding for a 404-amino-acid exporter protein, the reading frame for a 101-amino-acid LysR-like transcriptional regulator and the initial 51 bp of the Tn*floR*-associated transposase reading frame. Immediately thereafter, a complete copy of the insertion sequence IS*26* was detected (positions 14 150–14 969). This IS*26* element was 820 bp in size, had perfect 14 bp terminal inverted repeats and coded for a transposase protein of 234 amino acids. It was identical to that associated with the kanamycin resistance transposon Tn*2680*[19] and to a large number of IS*26* sequences from various enterobacterial species deposited in the databases, such as *E. coli* (AF550679), *Salmonella enterica* (AY333434), *Klebsiella pneumoniae* (AY123253), *Citrobacter freundii* (AF550415), *Enterobacter cloacae* (AY532647), *Serratia marcescens* (BX664015) and *Proteus vulgaris* (AP004237). It should also be noted that an IS*26*-flanked region encompassing the genes Δ*repA*, *repC*, *sul2*, *strA* and *strB* has been described recently on a plasmid from *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis.[20]

Integration and recombination sites in plasmid pCCK13698

The presence of a 96 bp IS*1592* relic, which was in the opposite orientation to the complete IS*1592* sequence, suggested that originally a not further specifiable part of pHS-Rec or of a pHS-Rec-related plasmid was flanked by two inverted copies of IS*1592*. While the right-hand copy remained complete, the left-hand copy was found to be largely truncated. A comparison of the pCCK13698 sequence with the corresponding sequences of the two plasmids RSF1010 and pHS-Rec revealed the presence of two potential recombination sites (see Figure 2). Recombination site 1 is 17 bp in size with 16/17 bases matching the IS sequence and 12/17 bases matching the RSF1010 sequence. Recombination site 2 consists of 15 bp with 15/15 bases matching the IS sequence



Figure 2. Potential recombination sites in the pCCK13698 sequence. Recombination site 1 is located at the junction between RSF1010-homologous sequences and the left-hand IS*1592* relic; recombination site 2 is located at the junction between the left-hand IS*1592* relic and pHS-Rec-homologous sequences; and recombination site 3 is located within the *strA* reading frame at the junction with the Tn*floR* sequence. The numbers refer to the database entries of RSF1010 (X04830), IS*1593* (AJ439064), pHS-Rec (AY862436), pMVSCS1 (AJ319822) and Tn*floR* (AF231986). Vertical bars indicate identical bases as compared to the pCCK13698 sequence. The recombination sites, where cross-over is believed to have occurred, are boxed.

and 9/15 bases matching the pHS-Rec sequence. Recombination involving these two sites might explain the deletion of the left-hand IS*1592* copy. A third recombination site was detected in the *strA* sequence and might have been used for recombination with part of the *floR* upstream sequence of Tn*floR*. This recombination site 3 comprised 16 bp with 12/16 bases matching the *strA* sequence of pMVSCS1 and 14/16 bases matching the Tn*floR* sequence.

A closer look at the sequences flanking the two complete insertion sequences revealed no direct repeats. For IS*1592*, it is not known whether it produces directly repeated sequences at the integration site. However, the Tn*5706*-associated elements IS*1596* and IS*1597*, which represent close derivatives of IS*1592*, are known to produce a 7 bp direct repeat at the integration site.[21] For IS*26*, it is known that it generates an 8 bp direct repeat.[12] The lack of direct repeats might suggest that besides the integration of these IS elements, further processes have occurred by which the directly repeated sequences at one or both ends were deleted or modified. The observation that the sequences up- and downstream of both IS elements were different might support this assumption.

In conclusion, this is the first report of antimicrobial resistance genes in *P. trehalosi*. The structural analysis of plasmid pCCK13698 revealed that it is almost exclusively composed of segments previously associated with other plasmids, transposons or insertion sequences and that interplasmid recombination processes might have played a role in the formation of this plasmid. Most of these plasmid and transposon segments have already been found in members of the family Pasteurellaceae. However, the occurrence of IS*26*—an insertion sequence widely distributed among Enterobacteriaceae—in the genus *Pasteurella* is a novel observation that supports the hypothesis of a gene flow between Pasteurellaceae and Enterobacteriaceae.

Acknowledgements

We thank Vera Nöding for excellent technical assistance. We acknowledge the veterinary laboratories participating in RESAP-ATH. Part of this work was supported by a grant of the French Ministry of Agriculture (Direction Générale de l'Alimentation).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B *et al.* Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 2004; **28**: 519–42.

2. Kehrenberg C, Mumme J, Wallmann J *et al.* Monitoring of florfenicol susceptibility among bovine and porcine respiratory tract pathogens collected in Germany during the years 2002 and 2003. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 572–4.

3. Kehrenberg C, Schwarz S. Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 773–5.

4. Braibant M, Chevalier J, Chaslus-Dancla E *et al.* Structural and functional study of the phenicol-specific efflux pump FloR belonging to

the major facilitator superfamily. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2965–71.

5. Doublet B, Schwarz S, Kehrenberg C *et al*. Florfenicol resistance gene *floR* is part of a novel transposon. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2106–8.

6. Kehrenberg C, Walker RD, Wu CC *et al*. Antimicrobial resistance in members of the family *Pasteurellaceae*. In: Aarestrup FM, ed. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington, DC: ASM Press, 2005; 167–86.

7. Sneath PH, Stevens M. *Actinobacillus rossi* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1990; **40**: 148–53.

8. Ward AC, Weiser GC, DeLong WJ *et al*. Characterization of *Pasteurella* spp. isolated from healthy domestic pack goats and evaluation of the effects of a commercial *Pasteurella* vaccine. *Am J Vet Res* 2002; **63**: 119–23.

9. Dyer NW, Ward AC, Weiser GC *et al*. Seasonal incidence and antibiotic susceptibility patterns of *Pasteurellaceae* from American bison (*Bison bison*). *Can J Vet Res* 2001; **65**: 7–14.

10. Catry B, Baele M, Opsomer G *et al*. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. *Vet Microbiol* 2004; **98**: 251–60.

11. Koneman EW, Allen SD, Janda WM *et al*. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th edn*. Philadelphia, New York: Lippincott, 1997; 416–23.

12. Azemun P, Stull T, Roberts M *et al*. Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; **20**: 168–70.

13. Kehrenberg C, Schwarz S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; **205**: 283–90.

14. Kehrenberg C, Schwarz S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Pasteurella aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2885–90.

15. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA *et al*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 3389–402.

16. Scholz P, Haring V, Wittmann-Liebold B *et al*. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 1989; **75**: 271–88.

17. Lancashire JF, Terry TD, Blackall PJ *et al*. Plasmid-encoded Tet B tetracycline resistance in *Haemophilus parasuis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1927–31.

18. Kehrenberg C, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of plasmid pMVSCS1 from *Mannheimia varigena*: identification of a multiresistance gene cluster. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 383–6.

19. Mollet B, Iida S, Shepherd J *et al*. Nucleotide sequence of IS*26*, a new prokaryotic mobile genetic element. *Nucleic Acids Res* 1983; **11**: 6319–30.

20. Daly M, Villa L, Pezzella C *et al*. Comparison of multiresistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 558–61.

21. Kehrenberg C, Werckenthin C, Schwarz S. Tn*5706*, a transposon-like element from *Pasteurella multocida* mediating tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2116–8.

Characterization of biofilm-forming abilities of isogenic mutants of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* carrying or not SGI1

Hayette Targant, Claire Prigent-Combaret, Marisa Haenni, Etienne Giraud, Mike Mulvey, Benoit Doublet, Axel Cloeckaert and Jean-Yves Madec[1]

[1] : Afssa Lyon. 31, ave Tony Garnier. 69364 Lyon Cedex 7

Key words : biofilm, *Escherichia coli*, *Salmonella*, SGI1

* : Corresponding author Tel : + 33 4 78 69 68 30 Fax : + 33 4 78 61 91 45 mel : jy.madec@lyon.afssa.fr

Abstract

Salmonella enterica is a major pathogen in humans and animals, and certain clones showed an indisputable successful spread like the multi-drug resistant SGI1-carrying *S. enterica* serotype Typhimurium of definitive phage type 104. It has also been speculated that SGI1 in *S. enterica* would not only be responsible for drug resistance but would also play a role in increased virulence, fitness and biofilm formation. In this work, six pairs of isogenic *Salmonella* or *Escherichia coli* strains harbouring or not SGI1 after experimental deletion or complementation demonstrated various levels of enhanced biofilm production. Colony morphology, cellulose and capsular polysaccharide production, and biofilm formation were investigated, and genes involved in production and regulation of curli and cellulose were detected. The biofilm production varies depending on the serovars and host origins of the strains, and reached the greatest level in an *E. coli* strain complemented with SGI1. To our best knowledge, this is the first time that the role of SGI1 in biofilm formation has been investigated in *E. coli*. In all, this study strongly reinforces the possible expanded role of SGI1 outside conferring resistance to antimicrobials, and particularly in the enhanced ability of SGI1-carriers to form biofilms.

Introduction

Salmonella enterica is a major zoonotic foodborne pathogen which causes outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis in humans worldwide [1] whereas poultry, pigs and cattle are considered as primary sources of salmonellosis. Even if the *Salmonella* serovar distribution varies widely among countries and over time, serovars Enteritidis and Typhimurium remain the two most frequently isolated ones in humans among the EU-Member States [2]. Additionally, the high incidence of drug resistance generally observed in these two serovars further increases the public health impact of the resulting infections [3].

In this respect, certain clones of *Salmonella* showed an indisputable successful spread in the recent past like the multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium of definitive phage type 104 (DT104) that was first described in UK in cattle in the mid-1980s and then worldwide in cattle and humans [4]. Strains of this clone are generally resistant to five antimicrobials (ampicillin, chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin, sulfonamides and tetracycline) and this phenotype is mostly conferred by a multidrug resistance cluster containing all resistance genes, which is a complex class 1 integron, named In104 and located in the 3' end of the 43-kb *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) [5,6,7]. SGI1 and variants (conferring different antibiotic resistance phenotypes) have also been described in other *S. enterica* serotypes including Agona, Albany, Cerro, Derby, Dusseldorf, Emek, Haifa, Infantis, Kentucky, Kiambu, Meleagridis, Newport, Paratyphi B, Tallahassee, Typhimurium and Virchow [8,9,10,11,12,13,14,15]. This widespread occurrence is likely attributed to horizontal gene transfer, as supported by the capability of SGI1 to be experimentally mobilized from SGI1-carriers to non-SGI1 recipients [16].

It has also been speculated that SGI1 in *Salmonella enterica* would not only be responsible for drug resistance but would also play a role in increased virulence and/or fitness [17,18]. This point is still an on-going issue but components specific to SGI1 were already associated with up-regulation of invasion genes resulting in enhanced pathogenicity in calves [17], thereby opening the door for future investigations on the possible co-regulatory role of SGI1 on virulence and/or fitness.

On the other hand, biofilm formation through extracellular structures including curli fimbriae, cellulose or various polysaccharides, is also part of the life cycle of *Salmonella enterica* and has obviously an impact on its persistence in host and colonization abilities. More specifically, strains of the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 clone were reported to produce biofilm efficiently [19,20] and SGI1 was also shown to contribute to an increased expression of *sthE*, a putative major fimbrial subunit in S. Typhimurium [21]. Also recently, Malcova *et al* examined the possibility that the acquisition of SGI1 resulted in increased biofilm formation that may have helped the successful spread of this clone [22]. These authors reported a statistically significant positive effect of SGI1 on biofilm formation, yet observed from a panel of *Salmonella* field strains that may also differ by other genetic features than SGI1.

Thus, we thought valuable to further explore this issue, but from pairs of isogenic *Salmonella* strains, mostly of the Typhimurium serovar, and harbouring or not SGI1 after experimental deletion or complementation. Finally, we also addressed this question through the complementation of an *Escherichia coli* strain with SGI1.

Materials and Methods

Bacterial strains

Six bacterial strains were included in this study, as well as their isogenic counterparts, containing or not SGI1, depending on their original background (Table 1). The *S.* Typhimurium DT104 strain 1948Sa96, initially harbouring SGI1, was deleted of the genomic island by use of the one-step chromosomal gene inactivation technique (Doublet *et al*, 2008). The resulting mutant was named 1948SA96ΔSGI1. For the other strains, transfer of SGI1 was carried out by conjugation according to the procedure described previously by Doublet *et al.* (2005). To confirm the presence or the absence of SGI1, all the strains were subjected to PCR mapping and antibiotic susceptibility testing as described previously (Boyd *et al*., 2001; 2002, Cloeckaert et al., 2000, Doublet *et al*., 2008). Bacteria were then cultivated on TSA plates (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and were stored at -80°C in BHI supplemented with 10% glycerol.

Colony morphology, cellulose and capsular polysaccharide production

After growth (18h) in liquid LB, bacterial cultures were diluted and plated on TSA to assess bacterial colony morphology or with calcofluor (20 µg/ml) to assess cellulose production. Colony morphology was determined after 96h at 28°C on the plates with appropriate growth. Cellulose production was assessed visually under fluorescent UV light. Capsular polysaccharide was detected using an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay (ELLA, Leriche 2000) adapted by Malcova *et al* [22]. Briefly, bacteria were placed for 1 hour in contact with 2 µl of concanavalin A labelled with peroxidase, then centrifuged. After removal of the

supernatant, three successive washes were carried out to eliminate unbound enzyme conjugate, followed by the addition of freshly mixed commercial 2,29-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) substrate solution. The reaction was allowed to develop for 15 min in darkness and the final absorbance was measured at 405 nm with a microplate reader. The capsular polysaccharide production per cell was obtained by dividing the $OD_{405\ nm}$ value by the initial $OD_{600\ nm}$.

Biofilm formation

Biofilm formation was assessed according to Patel and Sharma with the following modifications. Over-night cultures (18h) were diluted 1:4 in LB in order to obtain an $OD_{600\ nm}$ value equal to 0.1, and 200 ↘l were inoculated into a 96-well microtiter plate. A negative control (growth medium without bacteria) was included on each plate. Plates were incubated 96h at 28°C and the medium was renewed every 2 days. After incubation, wells were rinsed 3 times with distilled water, dried 1h at 60°C, and stained 30 min with crystal violet 0.4% (Sigma). Finally, the dye was removed, wells were rinsed 3 times and ethanol 95% was added to dissolve the crystal violet. Biofilm formation was measured at an OD of 570 nm, and final results were calculated by subtracting the $OD_{570\ nm}$ of the negative control. Experiments were performed in triplicates and each strain (and the control) was inoculated in 8 wells per replicate to ensure the reliability of the results.

Statistical analysis

The comparison of biofilm formation in presence or absence of SGI1 were performed by a *t*-test. ANOVA followed by Tuckey's test was used for the comparison of cellulose and capsular polysaccharide production among rdar and saw morphotypes.

Detection by PCR of genetic structures involved in production and regulation of curli and cellulose.

For all strains, three PCRs reactions were carried out to assess the presence of the genetic structures responsible for curli and cellulose biosynthesis. PCRs using primers Csg A-forward/ Csg B-reverse and Csg D-forward /Csg G-reverse allow respectively amplifications of two operons named *csgBA* and *csgDEFG* coding for the machinery for synthesis of curli in *Salmonella*. The PCR reaction using primers Bcs E-forward and Bcs G-reverse targets the *bcs*EFG operon involved in the cellulose biosynthesis process (Table 2). Amplification reactions were carried out with 200 µM deoxynucleoside triphosphate, 2 mM $MgCl_2$, 0.4 µM of each primer, 2.5 U of Taq polymerase (Roche) and approximately 10 to 50 ng of DNA template. Thermal cycling conditions consisted of an initial denaturation cycle (95°C, 5 min) followed by 35 cycles of denaturation (95°C, 30s), annealing (55°C, 30s) and extension (72°C, 90 s), and a final cycle of amplification (72°C, 5 min).

Sequence analysis.

Sequence analysis of SGI1 was done by using the BLASTN program (available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) in order to identify homologies with known genes implicated in biofilm formation.

Results

Colony morphology, cellulose/polysaccharide production and biofilm formation of the 1948Sa96 / 1948Sa96⇆SGI1 isogenic pair

In order to assess the suspected contribution of SGI1 to biofilm formation, we investigated whether a pair of isogenic *S.* Typhimurium strains only differing by the presence (1948Sa96 strain) or the absence (1948Sa96⇆SGI1 strain) of SGI1 may behave differently through various relevant *in vitro* assays. Indeed, both strains were tested for their colony morphology, expression of cellulose and curli fimbriae, capsular polysaccharide production and biofilm formation in microtitre plates. The two strains displayed clear different morphotypes at 28°C, with a red, dry and rough (rdar) phenotype for the 1948Sa96 strain and a smooth and white (saw) phenotype for the 1948Sa96⇆SGI1 strain (Figure 1A). A greater fluorescence with calcofluor was assessed visually (data not shown) with the 1948Sa96 strain compared to 1948Sa96⇆SGI1 strain, indicating an enhanced cellulose production in presence of SGI1. The capsular polysaccharide production was assessed three times independently by the ELLA assay and the 1948Sa↦⇣ strain was demonstrated to reach absorbance values of 4.498 +/- 0.097 while the corresponding values for the 1948Sa96⇆SGI1 strain were of 3.249 +/- 0.150 (Figure 1B). This difference was confirmed by ANOVA followed by a post hoc Tuckey's test and indicated a greater capsular polysaccharide production in the presence of SGI1. Finally, as assessed on plastic microplates, the 1948Sa↦⇣ strain was a greater (p= 0.025) biofilm producer (average biofilm formation 1.093 +/- 0.033) than the 1948Sa↦⇣⇆SGI1 strain (average biofilm formation 0.934 +/- 0.052).

Colony morphology, cellulose/polysaccharide production and biofilm formation of the other couples of isogenic strains

As the presence of SGI1 correlated with an increased ability to form biofilms for the 1948Sa96/1948Sa96⇆SGI1 pair, we further investigated another four couples of isogenic

185 strains with or without SGI1, three from the same Typhimurium serovar but from different
186 lineages or host origins and one from another serovar (Enteritidis).
187
188 Indeed, the *S.* Typhimurium LT2 F4 strain, which derived from the LT2 strain by
189 complementation with SGI1, also harboured a rdar phenotype at 28°C (and not the LT2
190 strain), greater fluorescence with calcofluor compared to LT2 strain (data not shown) and
191 absorbance values of 4.662. +/- 0.221 by the ELLA test, to be compared with corresponding
192 values of 3.698 +/- 0.229 for the LT2 strain (Figure 1B). Also, as assessed on plastic
193 microplates, the LT2 F4 strain was a greater (p = less than 0,0001) biofilm producer (average
194 biofilm formation 1.021 +/- 0.032) than the LT2 strain (average biofilm formation 0.851 +/-
195 0.018) (Figure 2).
196
197 In contrast, two other isogenic strains pairs of the Typhimurium serovar of human origin
198 (024217/024217+SGI1 and 023377/023377+SGI1), were never able to demonstrate a rough
199 phenotype, neither at 28°C nor at 37°C. As attested visually, no difference in fluorescence
200 was observed between isogenic strains of the same pair (data not shown). Also, the capsular
201 polysaccharide production was assessed three times independently and similar and low
202 absorbance values were obtained for the two couples (024217/024217+SGI1 : 2.677 +/- 0.024
203 / 2.741 +/- 0.020; 023377/023377+SGI1: 2.837 +/- 0.147 / 2.731 +/- 0.013) (Figure 1B). At
204 the end, none of the four strains were demonstrated to produce biofilms significantly
205 (024217/024217+SGI1 : 0.265 +/- 0.010 / 0.177 +/- 0.007; 023377/023377+SGI1: 0.131 +/-
206 0.03 / 0.124 +/- 0.005) (Figure 2). Similar observations were obtained with an isogenic strains
207 pair of the *S.* Enteritidis serovar (PT8/PT8+SGI1) as well. The PT8 and PT8+SGI1 were
208 never able to demonstrate a rough phenotype, neither at 28°C nor at 37°C and no difference in
209 fluorescence was observed between the two strains (data not shown). The capsular

polysaccharide (PT8/PT8+SGI1: 2.796 +/- 0.029 / 2.224 +/- 0.048) and biofilm productions (PT8/PT8+SGI1: 0.200 +/- 0.012 / 0.100 +0.004) were negligible as well (Figures 1 and 2).

Colony morphology, cellulose/polysaccharide production and biofilm formation of the *E. coli* / *E.coli*+SGI1 isogenic pair

Finally, the role of SGI1 in biofilm formation was analysed using an isogenic strains pair of *E. coli* (*E. coli*/*E. coli*+SGI1). Indeed, the *E. coli* strain complemented with SGI1 harboured a rdar phenotype at 28°C, greater fluorescence with calcofluor compared to the non-complemented strain (data not shown) and absorbance values of 5.914 +/- 0.132 by the ELLA test, to be compared with corresponding values of 2.865 +/- 0.204 for the non-complemented *E. coli* strain (Figure 1B). Also, as assessed on plastic microplates, the *E. coli*+SGI1 strain was a greater (p = less than 0,0001) biofilm producer (average biofilm formation 2.894 +/- 0.045) than the non-complemented strain (average biofilm formation 1.409 +/- 0.022) (Figure 2).

Detection of the genes involved in production and regulation of curli and cellulose.

In all strains, the presence of the genetic structures responsible for curli and cellulose biosynthesis were detected, namely the two *csgBA* and *csgDEFG* operons coding the machinery for synthesis of curli in *Salmonella*, and the *bcs*EFG operon involved in the cellulose biosynthesis process.

Discussion

In this study, we further investigated the hypothesis that SGI1 may confer an increased ability to SGI1 carriers compared to non-SGI1 carriers to form biofilms and produce extracellular structures contributing to biofilm formation, such as curli fimbriae, cellulose or capsular polysaccharides. In a recent work, Malcova *et al* explored this issue from a panel of field strains of *S*. Typhimurium that harboured or not SGI1 and concluded to a positive effect of SGI1 on biofilm formation in *S*. Typhimurium [22]. Indeed, the relevance of these results was based on a statistically significant partition between SGI1/non-SGI1 carriers and biofilm producers, that seemed to overcome the high diversity of the genetic backgrounds of the different strains tested.

Yet, we thought valuable to address now this issue from six pairs of isogenic strains that were expected to only differ by the presence or absence of SGI1, that was either experimentally deleted from SGI1-carrying isolates or introduced in non SGI1-carrying isolates. These strains pairs were either of the *S*. Typhimurium serovar (four pairs) but from different hosts (1 from cattle origin, 3 from human origin) or of another serovar (Enteritidis). An *E. coli*/*E. coli*+SGI1 pair was also included in the study. The corresponding mutants were described elsewhere [16,23] or specifically in this paper using the same methodology. No strain was tested that would have a native genotype experimentally restored from the mutants by SGI1 complementation or deletion. Indeed, potential unspecific effects on the biofilm formation of the introduction or deletion of SGI1 in these isolates cannot be totally excluded and this may be considered in a future work also including a larger variety of strains. Yet, to our knowledge, this study is the first one reported so far assessing the possible role of SGI1 in biofilm formation through a panel of experimental mutants.

At first, we deleted SGI1 from a natural SGI1-carrier of the *S*. Typhimurium serovar and compared it with its original counterpart. Indeed, the results indicated a positive effect of SGI1 on the biofilm-forming ability of this strain. Conversely, SGI1 was introduced in a non-SGI1 recipient of the *S*. Typhimurium serovar and the resulting mutant was demonstrated to be a greater biofilm producer. At 28°C and not at 37°C, and only in the presence of SGI1, a rugose phenotype (rdar morphotype) was observed, which is known to require curli [24,25], aggregative fimbriae [26] and cellulose [25] whose synthesis or assemblage occur below 30°C under regulation of the transcriptional regulator CsgD [19,27,28]. These results which are strongly in favour of a specific association of SGI1 and the rugose phenotype are also in accordance with previous data reported by Golding *et al* on this latter mutant (ST LT2) [21]. Indeed, twenty-two chromosomal genes were significantly upregulated in ST LT2 harbouring SGI1, which included the *sthE* gene encoding a putative major fimbrial subunit that should be involved in the production of the extracellular matrix that enables adhesion to surfaces and biofilm formation.

On the other hand, introducing SGI1 in non-SGI1 recipients did not necessarily induce a biofilm production. This was observed for two strains of the *S*. Typhimurium serovar and one strain of the *S*. Enteritidis serovar, that did not harbour a rugose phenotype at any temperature nor were shown to produce cellulose before complementation with SGI1. The regulatory system which governs the production of curli and cellulose in *S. enterica* serovar Typhimurium is known to be complex [19]. White *et al* [29] suggested that curli and cellulose would be under similar regulation whereas, surprisingly, lipopolysaccharide (LPS) mutants were shown by others to produce decreased levels of curli and increased amounts of cellulose [19], highlighting the importance of LPS alterations in biofilm formation. It has also been shown that intercellular complementation of curli subunits between curli-producing and non-

curli-producing *S. enterica* Serovar Enteritidis was blocked by LPS [29]. In this context, and irrespective to the serovar, a role of SGI1 in the regulatory pathway of the cellulose production can be hypothesized, that would anyway remains inefficient in strains that do not produce cellulose due to other mediators of regulation of cellulose synthesis linked to LPS alterations. Therefore, molecular investigations of the LPS integrity in our mutants would be a valuable extension of this work.

Interestingly, the greater biofilm production in our panel of strains was observed with an *E. coli* strain complemented with SGI1, in comparison with its native counterpart. To our best knowledge, this is the first time that the role of SGI1 in biofilm formation was investigated in *E. coli*. This observation is of particular interest considering the phylogenetic proximity between both species. Therefore, beside confirming these data, further work would be valuable to explore the possible molecular mechanisms that may explain why SGI1 may confer increased biofilm-forming abilities in an *E. coli* background. On the other hand, as SGI1 was shown to be experimentally mobilisable from *Salmonella* to *E. coli*, this result raises the question of the risk of an increased fitness or virulence of putative SGI1-carrying *E. coli* strains that may exist naturally.

Apart from the 13 kb region located near the 3' end of the SGI1, which contains a well-known antibiotic resistance gene cluster, most of the functions of the open reading frames (ORFs) encoded within SGI1 are poorly understood, and some of them do not even show any similarity with known sequences in GenBank [5]. However, in limited studies, it appeared that SGI1 would contain co-regulatory elements of the expression of proteins involved in virulence phenotypes [18,30]. Notably, sequences homologies exist between DNA sequences within SGI1 (ORFs S007 and S044) and the gene encoding the diguanylate-cyclase (DGC),

which is transcriptionally activated by the major biofilm regulator CsgD in *S. enterica* serovar Typhimurium and generates c-di-GMP, an allosteric activator of cellulose synthetase [27].

In conclusion, our data are in accordance with recent data reported from field strains by Malcova *et al* [22], arguing for a role of SGI1 in biofilm formation that may have helped SGI1-carriers to get selective advantages in persistence or fitness. It is also interesting to note that sub-inhibitory concentrations of some antibiotics like cefotaxime were shown to significantly induce biofilm production by human isolates of *S.* Typhimurium [31]. Indeed, it can be inferred that biofilm production would be even more facilitated in resistant isolates carrying SGI1. All together, the ecological success of the *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 may well rely on a mosaic of phenotypic and genetic properties that include not only antimicrobial resistance but also environmental persistence related to biofilm formation abilities. At the end, the strongly increased biofilm-ability of an SGI1-carrying *E. coli* strain again argues for a role of this island outside of antimicrobial resistance and addresses possible new risks whenever SGI1 should have disseminated in natural *E. coli* strains.

Legends:

Table 1:

List of strains used in this study. Presence/absence of SGI1 (presence : +, absence : -), serovar, host origin and references are indicated.

Table 2:

List of primers used in this study.

Figure 1:

A. Red, dry and rough (rdar) (left) and smooth and white (saw) (right) morphotypes observed at 28°C for the 1948Sa96 (left) and 1948Sa⇆SGI1 (right), respectively. All other rugose phenotypes observed at 28°C in this study were of the rdar morphotype. All other smooth phenotypes observed at 28°C in this study were of the saw morphotype.

B. Capsular polysaccharide production as assessed by the ELLA assay. Each spot represents the mean of three optical densities measured independently. For better clarity, standard deviations were only introduced in the text but were not reported on the graph.

Figure 2:

Biofilm production determined for the six pair of isogenic strains. Each spot represents the mean of three optical densities measured independently. For better clarity, standard deviations were only introduced in the text but were not reported on the graph.

Acknowledgments:

This study was funded by the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)

References:

1. Thorns CJ (2000) Bacterial food-borne zoonoses. Rev Sci Tech 19: 226-239.

2. Velge P, Cloeckaert A, Barrow P (2005) Emergence of Salmonella epidemics: the problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet Res 36: 267-288.

3. Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, et al. (2009) Virulotyping and Antimicrobial Resistance Typing of Salmonella enterica Serovars Relevant to Human Health in Europe. Foodborne Pathog Dis.

4. Ridley A, Threlfall EJ (1998) Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic Salmonella typhimurium DT 104. Microb Drug Resist 4: 113-118.

5. Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, et al. (2001) Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J Bacteriol 183: 5725-5732.

6. Cloeckaert A, Schwarz S (2001) Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in Salmonella enterica typhimurium DT104. Vet Res 32: 301-310.

7. Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A (2006) The genetics of Salmonella genomic island 1. Microbes Infect 8: 1915-1922.

8. Boyd DA, Shi X, Hu QH, Ng LK, Doublet B, et al. (2008) Salmonella genomic island 1 (SGI1), variant SGI1-I, and new variant SGI1-O in proteus mirabilis clinical and food isolates from China. Antimicrob Agents Chemother 52: 340-344.

9. Chiu CH, Chen HL, Kao LS, Yang CY, Chu C, et al. (2007) Variant Salmonella genomic island 1 antibiotic resistance gene clusters in Salmonella enterica serovar Derby isolates from humans in Taiwan. J Antimicrob Chemother 59: 325-326.

10. Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Demartin M, Weill FX (2006) Variant Salmonella genomic island 1-L antibiotic resistance gene cluster in Salmonella enterica serovar Newport. Antimicrob Agents Chemother 50: 3944-3946.

382 11. Doublet B, Weill FX, Fabre L, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A (2004) Variant
383 Salmonella genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-
384 N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, aac(3)-Id, in Salmonella enterica
385 serovar newport. Antimicrob Agents Chemother 48: 3806-3812.
386 12. Doublet B, Lailler R, Meunier D, Brisabois A, Boyd D, et al. (2003) Variant Salmonella
387 genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in Salmonella enterica serovar
388 Albany. Emerg Infect Dis 9: 585-591.
389 13. Levings RS, Partridge SR, Djordjevic SP, Hall RM (2007) SGI1-K, a variant of the SGI1
390 genomic island carrying a mercury resistance region, in Salmonella enterica serovar
391 Kentucky. Antimicrob Agents Chemother 51: 317-323.
392 14. Levings RS, Lightfoot D, Partridge SR, Hall RM, Djordjevic SP (2005) The genomic
393 island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of Salmonella enterica
394 serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other S. enterica
395 serovars. J Bacteriol 187: 4401-4409.
396 15. Meunier D, Boyd D, Mulvey MR, Baucheron S, Mammina C, et al. (2002) Salmonella
397 enterica serotype Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in
398 serotype paratyphi B. Emerg Infect Dis 8: 430-433.
399 16. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckaert A (2005) The Salmonella genomic island 1
400 is an integrative mobilizable element. Mol Microbiol 55: 1911-1924.
401 17. Rasmussen MA, Carlson SA, Franklin SK, McCuddin ZP, Wu MT, et al. (2005) Exposure
402 to rumen protozoa leads to enhancement of pathogenicity of and invasion by multiple-
403 antibiotic-resistant Salmonella enterica bearing SGI1. Infect Immun 73: 4668-4675.
404 18. Carlson SA, McCuddin ZP, Wu MT (2005) SlyA regulates the collagenase-mediated
405 cytopathic phenotype in multiresistant Salmonella. Microb Pathog 38: 181-187.

406 19. Anriany YA, Weiner RM, Johnson JA, De Rezende CE, Joseph SW (2001) *Salmonella*
407 *enterica* serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype. Appl Environ
408 Microbiol 67: 4048-4056.
409 20. de Rezende CE, Anriany Y, Carr LE, Joseph SW, Weiner RM (2005) Capsular
410 polysaccharide surrounds smooth and rugose types of Salmonella enterica serovar
411 Typhimurium DT104. Appl Environ Microbiol 71: 7345-7351.
412 21. Golding GR, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A, Christianson S, et al. (2007) The effect
413 of the Salmonella genomic island 1 on in vitro global gene expression in Salmonella
414 enterica serovar Typhimurium LT2. Microbes Infect 9: 21-27.
415 22. Malcova M, Hradecka H, Karpiskova R, Rychlik I (2008) Biofilm formation in field
416 strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium: identification of a new colony
417 morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. Vet Microbiol 129: 360-
418 366.
419 23. Doublet B, Golding GR, Mulvey MR, Cloeckaert A (2008) Secondary chromosomal
420 attachment site and tandem integration of the mobilizable Salmonella genomic island
421 1. PLoS One 3: e2060.
422 24. Romling U, Sierralta WD, Eriksson K, Normark S (1998) Multicellular and aggregative
423 behaviour of Salmonella typhimurium strains is controlled by mutations in the agfD
424 promoter. Mol Microbiol 28: 249-264.
425 25. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U (2001) The multicellular
426 morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the
427 second component of the extracellular matrix. Mol Microbiol 39: 1452-1463.
428 26. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, et al. (2002) Role of
429 Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. Science 295: 851-
430 855.

27. Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Romling U Bistable expression of CsgD in biofilm development of Salmonella enterica serovar typhimurium. J Bacteriol 192: 456-466.

28. Gerstel U, Romling U (2003) The csgD promoter, a control unit for biofilm formation in Salmonella typhimurium. Res Microbiol 154: 659-667.

29. White AP, Gibson DL, Collinson SK, Banser PA, Kay WW (2003) Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of Salmonella enterica serovar enteritidis. J Bacteriol 185: 5398-5407.

30. Wu MT, Carlson SA, Meyerholz DK (2002) Cytopathic effects observed upon expression of a repressed collagenase gene present in Salmonella and related pathogens: mimicry of a cytotoxin from multiple antibiotic-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium phagetype DT104. Microb Pathog 33: 279-287.

31. Majtan J, Majtanova L, Xu M, Majtan V (2008) In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium isolated in Slovakia. J Appl Microbiol 104: 1294-1301.

Table 1

Strains	Serovar	SGI1	Host origin	References
1948Sa96	Typhimurium	+	cattle	Doublet *et al* (2008)
1948Sa96 ΔSGI1	Typhimurium	-	cattle	Doublet *et al* (2008)
LT2	Typhimurium	-	human	Doublet *et al* (2005)
LT2 + SGI1 F4	Typhimurium	+	human	Doublet *et al* (2005)
24217	Typhimurium	-	human	INRA Nouzilly
024217 + SGI1	Typhimurium	+	human	This study
23277	Typhimurium	-	human	INRA Nouzilly
023277 + SGI1	Typhimurium	+	human	This study
PT8	Enteritidis	-		
PT8 + SGI1	Enteritidis	+		
E.coli K12J5		-		INRA Nouzilly
E.coli K12J5 + SGI1		+		This study

Table 2

Primers	Target genes	Nucleotidic sequence 5'-3'
Csg A-forward	csg A, csg B	GTTGTTGCCAAAACCAACCT
Csg B-reverse		GTCAAGTCGGCACGGATAAT
Csg D-forward	csg D, csg E, csg F, csg G	GCCTCATATTAACGGCGTGT
Csg G-reverse		ATAATATTTGCCGCCGTCAG
Bcs E-forward	bcs E to bcs G	ATGACGCAGCCGTTGAAACT
Bcs G-reverse		AAGGTGTTCAACCAGGCGTT

Figure 1

A



B

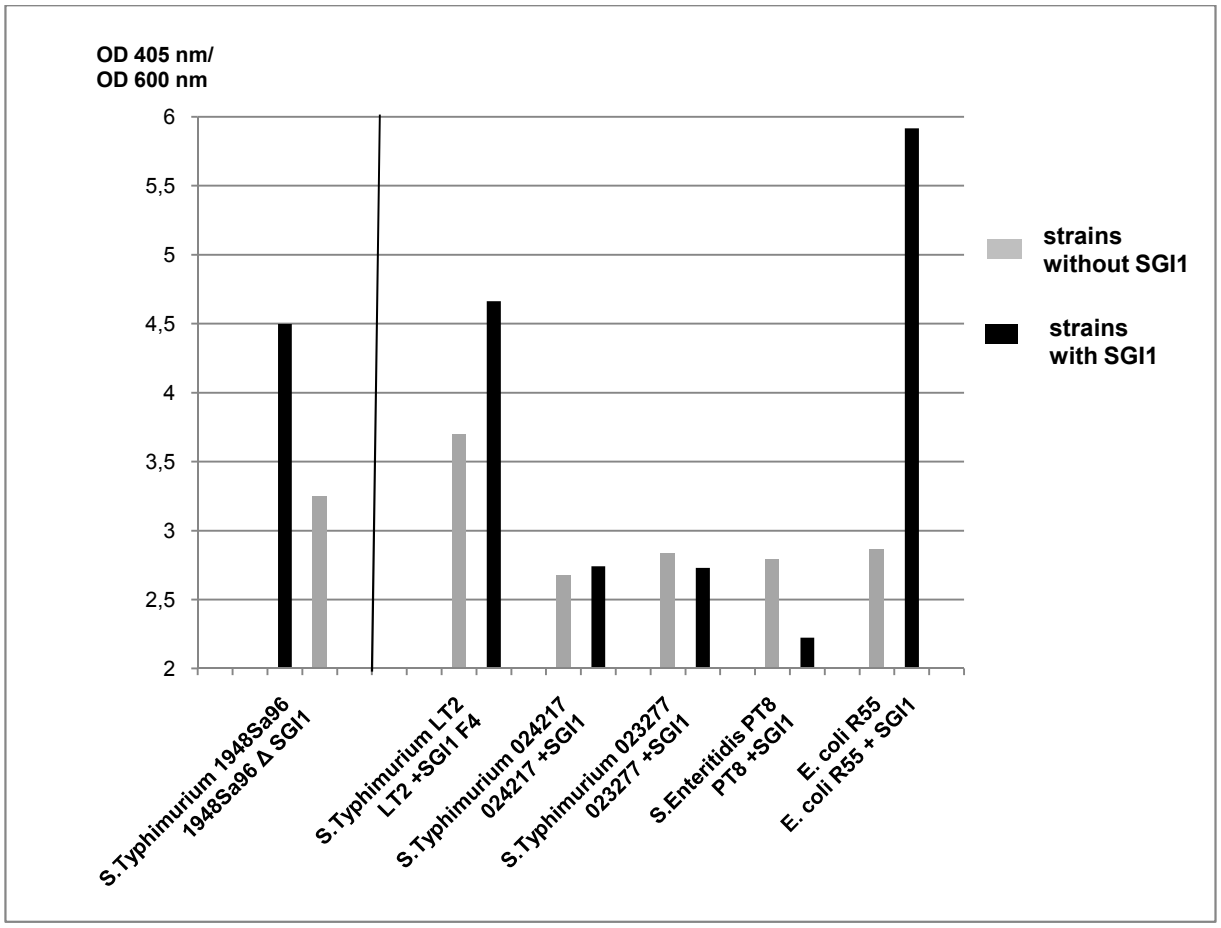
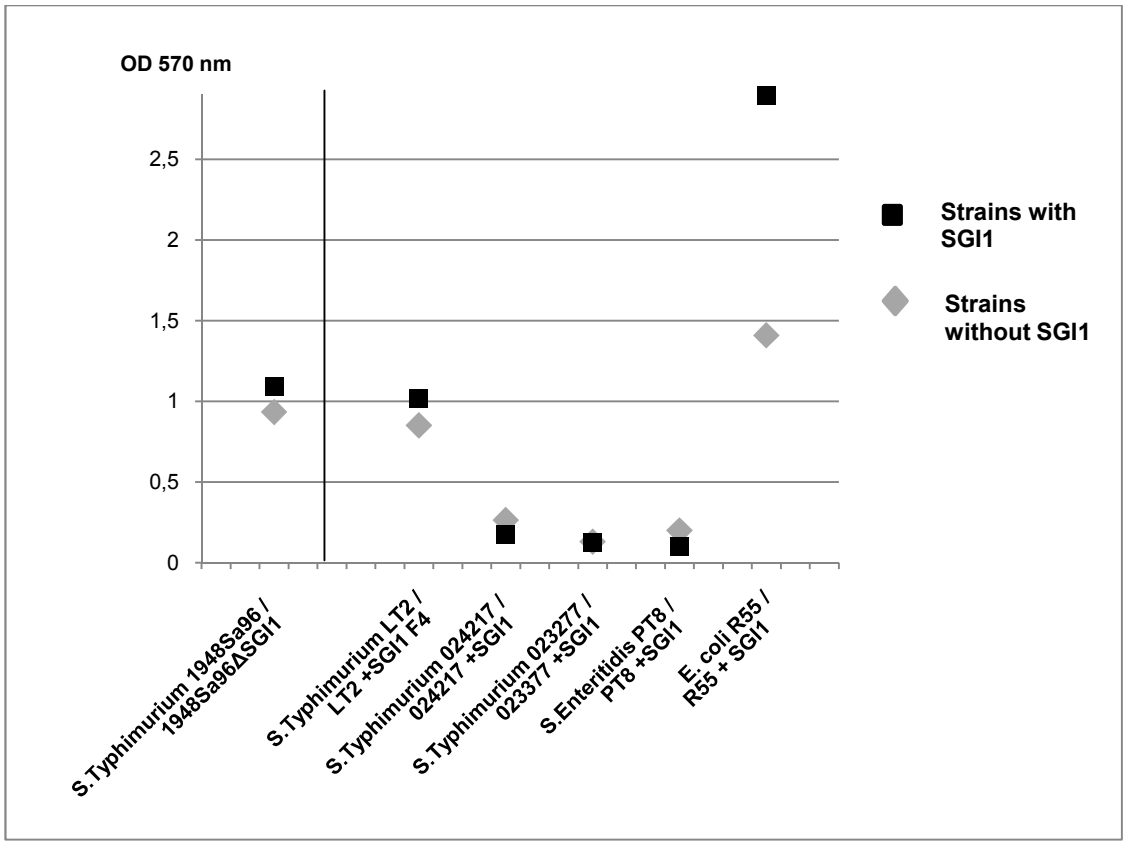

OD 405 nm/
OD 600 nm
6
5,5
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
strains without SGI1
strains with SGI1
S.Typhimurium 1948Sa96
1948Sa96 Δ SGI1
S.Typhimurium LT2
LT2 +SGI1 F4
S.Typhimurium 024217
024217 +SGI1
S.Typhimurium 023277
023277 +SGI1
S.Enteritidis PT8
PT8 +SGI1
E. coli R55
E. coli R55 + SGI1

Figure 2


OD 570 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Strains with SGI1
Strains without SGI1
S.Typhimurium 1948Sa96 / 1948Sa96ΔSGI1
S.Typhimurium LT2 / LT2 +SGI1 F4
S.Typhimurium 024217 / 024217 +SGI1
S.Typhimurium 023277 / 023377 +SGI1
S.Enteritidis PT8 / PT8 +SGI1
E. coli R55 / R55 + SGI1

RESUME

RESUME : Les salmonelles sont l'une des premières causes d'infections bactériennes d'origine alimentaire. Depuis le début des années 1990, l'isolement de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques a considérablement accru avec l'émergence des souches épidémiques *Salmonella* Typhimurium DT104 qui sont, pour la majorité, résistantes à l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et les tétracyclines. Les gènes codant ces résistances sont regroupés sur un intégron complexe de classe 1 nommé In104, localisé lui-même sur un îlot génomique de 43 kb désigné *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1). Depuis sa première identification chez *S.* Typhimurium DT104, SGI1 a été identifié à travers le monde chez plusieurs sérovars de *Salmonella,* et plus récemment chez *Proteus mirabilis*. Chez ces souches, la multirésistance aux antibiotiques est liée, soit à l'îlot SGI1 dans sa forme initialement décrite, soit à des variants de SGI1 correspondant à la structure initiale de SGI1 comportant des modifications au niveau de l'intégron complexe In104. L'îlot génomique *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) représente une préoccupation importante car le phénotype de multirésistance qu'il confère aux souches bactériennes est souvent responsable d'échecs thérapeutiques pouvant entrainer des complications importantes, voire la mort. Dans ce contexte, le travail de thèse a été centré sur l'enjeu sanitaire majeur représenté par cette diffusion épidémique du clone *S.* Typhimurium au cours des années 1990 chez l'homme et les bovins.

Les travaux entrepris dans le cadre de la thèse ont eu, en premier lieu, l'objectif d'apprécier l'évolution moléculaire de SGI1 dix années après l'émergence de ces souches en élevage bovin, puis d'évaluer la diffusion de SGI1 chez des souches naturelles appartenant à d'autres genres bactériens que *Salmonella.* Il a ainsi été dressé un bilan de la multirésistance aux antibiotiques chez les souches de *S.* Typhimurium isolées de bovins malades en France de 2002 à 2007 et une recherche de la présence de SGI1, chez d'autres espèces bactériennes que *Salmonella*, et par sondage à partir de leurs phénotypes de résistance, a été mise en œuvre. Les résultats obtenus ont indiqué un faible pouvoir évolutif de SGI1 qui semble en contradiction avec les capacités moléculaires majeures de recombinaison et de transfert démontrées tant *in vitro* qu'*in vivo*. Les études menées ont toutefois permis la première description d'un nouveau variant, nommé SGI1-T, qui résulte d'une recombinaison intramoléculaire.

Le deuxième grand objectif de la thèse a été de contribuer à une meilleure connaissance du rôle que pourrait avoir SGI1 dans la virulence bactérienne. Une première stratégie de modélisation expérimentale (salmonellose systémique murine) a ainsi été conduite, qui visait à comparer le pouvoir virulent *in vivo* de souches isogéniques ne se distinguant que par la présence ou l'absence de SGI1. Une seconde approche a été également menée, qui a consisté en une évaluation du rôle de SGI1 dans la formation de biofilms, l'organisation en biofilms favorisant une meilleure colonisation bactérienne, qui peut constituer à son tour un élément d'efficacité du pouvoir virulent final. Les résultats obtenus ont confirmé le rôle positif de SGI1 dans la formation de biofilms, et plus généralement son implication dans la signalisation cellulaire du Quorum Sensing.

TITLE: The multidrug resistance island, *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1): variability, inter-species diffusion and implication in virulence.

ABSTRACT: *Salmonella* is a major cause of food-borne outbreaks. Since the early 1990s, isolation of multidrug-resistant *Salmonella* has increased with the emergence of epidemic *Salmonella* Typhimurium DT104 strains which are mostly resistant to ampicilin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracyclines. The genes coding these resistances are clustered on a complex class 1 integron (MDR region) located on a genomic island of 43 kb designated SGI1. Since its first identification in *S*. Typhimurium DT104, SGI1 has been identified worldwide in other *Salmonella* serotypes, and more recently in *Proteus mirabilis*. For these strains, multidrug resistance is conferred, either to the classical structure of SGI1, or to related variants of SGI1 corresponding to the initial structure of SGI1 with modification of the complexe integron In104. The *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) constitutes a great concern since it confers a multidrug resistance phenotype often responsible of therapeutic failures which may cause important complications, or even death. In this context, the work has been focused on the major health issue represented by the epidemic diffusion of the *Salmonella* Typhimurium clone in the course of 1990s in human and cattle.

As a first objective, the work allowed to appreciate the molecular evolution of SGI1 in the course of time and to assess the diffusion of SGI1 to other bacterial strains than *Salmonella* in natural conditions. Therefore, an overview of the multidrug resistance in *Salmonella* Typhimurium strains isolated from diseased cattle in France from 2002 to 2007 was carried out and a screening of natural strains from other bacterial species than *Salmonella* that may harbor SGI1 was undertaken. The results indicated weak molecular evolutions of SGI1, which seems in contradiction with the great capability of SGI1 to recombine and transfer, as attested *in vitro* as i*n vivo*. Nevertheless, this study allowed the first description of a new SGI1 variant, named SGI1-T, which is the result of intra-molecular recombination events.

Another second objective of the thesis was to contribute to a better knowledge of the role of SGI1 in bacterial virulence. A strategy of experimental modeling (murine systemic salmonellosis) was first set up to compare the levels of virulence conferred by isogenic strains differing only by the presence or the absence of SGI1. A second approach was also carried out to evaluate the role of SGI1 in biofilm formation. Indeed, the organization in biofilm facilitates bacterial colonization, which constitutes in turn an element of effectiveness of the final virulence. A positive role of SGI1 in biofilm formation was demonstrated in the framework of this study, and more generally, questions the role of SGI1 in the Quorum Sensing regulation system.

DISCIPLINE : microbiologie, biologie moléculaire, biochimie.

MOTS-CLES : *Salmonella*, SGI1, multirésistance aux antibiotiques, virulence, biofilm, quorum sensing, *S*. Typhimurium DT104

LABORATOIRE : AFSSA Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 7.