

Analyse de la diversité génétique des plasmides d'*Escherichia coli* antibiorésistants causant la colibacillose aviaire

Salah-Eddine BAKKALI YAKHLEF^{1*}, Nour-Eddine ASSALI²,
Abdelkader AMARA³ & Abdel-Majid BELABED¹

(Reçu le 07/01/2002 ; Accepté le 17/06/2002)

تحليل التنوع الوراثي لبلازميدات القولون المقاومة للمضادات الحيوية والمسؤولة عن الحمى التسممية

أظهرت دراسة سابقة أجريت على الأورمة القولونية (*E. coli*) التي تم فرزها من دجاج اللحم مصاب بالحمى التسممية colibacillose أنها غنية بلازميدات هذه البكتيريا. خلال هذا البحث تم اعتماد تقنية "hybridation moléculaire" التي تمثلت في استعمال المسبار "2 kb" المستخرج من الحامض النووي لإحدى البكتيريات المستعملة كعينة لدراسة العلاقات الموجودة بين البلازميدات. أظهرت نتائج هذه الدراسة وجود تماثل كبير بين البلازميدات و بالتالي انتمائها لنفس "profil d'hybridation" كما أظهرت تنوعا وراثيا لبلازميدات هذه البكتيريات.

الكلمات المفتاحية: الإشريكيكولي - دواجن - بلازميد - التنوع الوراثي - hybridation moléculaire

Analyse de la diversité génétique des plasmides d'*Escherichia coli* antibiorésistants causant la colibacillose aviaire

Les souches d'*Escherichia coli* aviaires antibiorésistantes sont porteuses de plasmides à une fréquence très élevée. Dans une étude antérieure, l'hétérogénéité de ces plasmides a été montrée. Une sonde d'ADN plasmidique (2 kb) extraite de l'une de ces souches a été utilisée dans la technique du Southern blot pour analyser les relations existantes entre les plasmides. À partir de poulets atteints de colibacillose et provenant de différentes fermes d'élevage, les plasmides de 22 souches d'*E. coli* ont été isolées. La sonde s'est hybridée avec tous les profils plasmidiques de ces souches, ce qui est en faveur de la présence d'une grande homologie de séquence entre ces plasmides ainsi que leur appartenance au même groupe d'hybridation. Le profil d'hybridation confirme l'hétérogénéité des plasmides contenus dans ces souches.

Mots clés : *Escherichia coli* - Poulet - Plasmide - Diversité génétique - Hybridation moléculaire

Plasmidial genetic diversity analysis of antibiotic-resistant *Escherichia coli* causing avian colibacillosis

Avian antibioretistant strains of *Escherichia coli* show a high level of plasmidial content. Plasmidial profiles of these strains have been shown to be heterogenous in a previous study. A plasmidial probe (2 kb) extracted from one of the *E. coli* strains, have been used in the southern blot technics to study the relationships between these plasmids. 22 *E. coli* strains, isolated from cases of avian colibacillosis, have been used in this study. This probe have been hybridised with all the plasmids hosted by *E. coli* strains, indicating a high level of sequence homology between these plasmids and their "belonging" to the same hybridisation groupe. The hybridisation profil confirm the plasmid heterogeneity among these strains.

Key words : *Escherichia coli* - Avian - Plasmid - Genetic diversity - Molecular hybridisation

¹ Faculté des Sciences, Université Mohamed 1^{er}, Oujda, Maroc

² Département d'Écologie végétale, Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat

³ Département de Pathologie Aviaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat

* Auteur correspondant ; e-mail : sby9@caramail.com

INTRODUCTION

Les souches d'*Escherichia coli*, responsables chez le poulet de chair de la colibacillose aviaire au Maroc, présentent des fréquences de résistance aux antibactériens très élevées avec une tendance nette à la multirésistance (Amara, 1996). Ces souches ont montré une richesse plasmidiale ainsi qu'une diversité génétique de ces plasmides (Bakkali Yakhlef *et al.*, 2000).

Il a été établi que les plasmides R sont responsables de la résistance aux antibiotiques parmi les isolats cliniques des bactéries pathogènes, en l'occurrence les entérobactéries (Datta *et al.*, 1971). De nombreuses études structurales ont montré que les plasmides de résistance étaient susceptibles d'évoluer *in vivo* par acquisition ou perte successive de déterminants de la résistance (Steen & Sköld, 1985). Cette évolution, qui rend partiellement compte de l'émergence de souches multirésistantes, est une conséquence du caractère transposable de la majorité des gènes de résistance (Grinsted, 1986). Par ailleurs, les plasmides sont surtout échangés entre bactéries de la même espèce, mais ils peuvent l'être également entre bactéries d'espèces différentes voire, plus exceptionnellement, de genres différents (Linton, 1982) et entre souches pathogènes et souches qui ne les sont pas (Whiteman & Bickford, 1983). Cela explique la dissémination parfois explosive d'un plasmide au sein d'une population bactérienne faite d'espèces différentes.

Dans ce travail, on a utilisé la technique d'hybridation moléculaire pour déterminer les relations pouvant exister entre les plasmides des souches d'*E. coli* aviaires. Ces souches ont déjà fait l'objet d'une caractérisation des profils plasmidiques (Bakkali Yakhlef *et al.*, 2000).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Isolement et identification des souches d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* ont été isolées à partir des organes : cœur et foie de poulets atteints de colibacillose aviaire. Les milieux utilisés pour l'isolement sont : la gélose à l'éosine et au bleu de méthylène (bioMérieux). La purification des isolats est effectuée sur le milieu Trypticase Soy Agar (Institut Pasteur). L'identification

biochimique est réalisée via la recherche des caractères standards pour la différenciation des entérobactéries.

2. Antibiogramme

La sensibilité des isolats aux différents agents antibactériens testés est déterminée suivant la technique des disques par diffusion en gélose de Mueller - Hinton (Institut Pasteur) selon la méthode de l'Institut Pasteur (Anonyme, 1993).

3. Milieu et culture bactérienne

La culture des bactéries est réalisée dans le milieu LB (Maniatis *et al.*, 1982) contenant les antibiotiques appropriés (Tableau 1). Elle est incubée ensuite dans un bain-marie à 37°C sous agitation pendant une nuit.

4. Extraction et purification de l'ADN plasmidique

Le protocole utilisé pour l'extraction et la purification des plasmides est basé sur la technique de lyse alcaline développée par Birnboim & Doly (1979). 3 ml d'une préculture en phase exponentielle sont centrifugés dans des tubes Eppendorf (10 000 g pendant 2 mn). Le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon I (Tris-HCl, pH 8, 25 mM; Glucose, 50 mM; EDTA, 10 mM). 5 µg/ml de lysozyme sont ajoutés à chaque tube suivi d'une incubation à 37°C pendant 15 mn. 200 µl d'une solution de lyse (NaOH 0,2 N; SDS, 1%) sont alors additionnées et le tout est maintenu dans de la glace pendant 10 mn. La solution est neutralisée à l'aide de 150 µl d'acétate de sodium 3M (pH 4,8) et laissée 30 mn dans de la glace. Elle est centrifugée pendant 15 mn à 10 000 g. Le culot de plasmides est repris dans 200 µl de tampon TE (50 mM tris, pH 8; 5 mM EDTA) puis reprécipité à l'éthanol en présence d'acétate de potassium (1M). Après centrifugation, le culot de plasmides est repris dans 50 µl de TE puis traité à la RNase. Les plasmides sont séparés par électrophorèse sur gel d'Agarose à 0,8% contenant du bromure d'éthidium. Pour visualiser les bandes d'ADN, le gel est déposé sur un transilluminateur à UV (302 nm).

La digestion des plasmides est réalisée par l'enzyme *EcoR I* (Sigma, France) en présence du tampon spécifique de l'enzyme et à la température recommandée par le producteur. Les séquences de résistance (Antibiotypes) et la présence de bandes

d'ADN plasmidique sont montrés dans le tableau 1.

Tableau 1. Séquences de résistance et caractères des souches d'*E. coli*

Souche	Origine	Antibiotype	Richesse plasmidique
1	Rabat	SSS/OT/S/SXT	++
2	Rabat	SXT/OT/C/SSS/UB	++
3	Soualem	C/UB/NA/OA/SPT	++
4	Soualem	C/UB/NA/OA/SPT	++
5	Rabat	NA/GM/OA/SXT/C/SSS	++
6	Rabat	SSS/NA/GM/C/SXT	-
19	Rabat	SXT/SSS/SPT/OT	++
20	Rabat	C/SSS/NA/OT/UB/SXT	++
21	Rabat	UB/NA/OA/SPT	++
22	Rabat	UB/NA/OA/SPT	++

(+ +) : Richesse en bandes plasmidiques, (-): Absence de plasmide. Ampicilline (AM), Amoxicilline (AMX), Streptomycine (S), Spectinomycine (SPT), Gentamicine (GM), Chloramphénicol (C), Oxytétracycline (OT), Colistine (CS), Sulfamides (SSS), Association triméthoprine / sulfaméthoxazole (SXT), Furanes (FT), Acide nalidixique (NA), Acide oxolinique (OA), Fluméquine (UB)

5. Southern blott et hybridation

Le transfert de l'ADN plasmidique digéré du gel au filtre de nylon hybond N⁺ (Amersham) est effectué suivant la technique du Southern (1975). La purification de la sonde d'ADN plasmidique à partir du gel d'agarose est réalisée selon la méthode " Squeeze freeze ".

La sonde (2 kb), représentant un fragment d'ADN plasmidique extrait de la souche 1, a été purifiée et marquée au DIG-dUTP suivant la procédure de marquage par amorçage aléatoire (Boehringer, 1993).

L'hybridation est réalisée selon le protocole du SSPE. Il commence par une étape de blocage et de préhybridation, qui permet d'éviter les hybridations non spécifiques sur la membrane.

Après la préhybridation, la sonde rendue préalablement simple brin par chauffage (10 min à 100°C) est ajoutée à la solution d'hybridation. La réaction d'hybridation est incubée pendant au moins 16 h à 65°C.

Après hybridation, la sonde résiduelle non hybridée est éliminée par une série de lavages réduisant ainsi le bruit de fond. La détection de la sonde hybridée est réalisée par une réaction immunologique. La visualisation du profil

d'hybridation a été effectuée par chemiluminescence.

RÉSULTATS

1. Analyse des profils restrictifs

Parmi les 22 souches étudiées, les isolats 6, 7 et 16 ne présentent pas de plasmides, bien qu'elles soient multirésistantes. Il s'agit donc d'une résistance codée par des gènes chromosomiques.

Les plasmides de la souche 5 ont été complètement digérés par EcoR I indiquant l'existence d'un grand nombre de sites de restriction tout au long de la séquence nucléique (Figure 1). À l'exception de certaines bandes communes aux souches, ces profils montrent l'existence d'une diversité génétique du contenu plasmidial de celles-ci. Cette diversité existe même au sein de certaines souches provenant d'une même origine et présentant les mêmes antibiotypes. Ceci laisse supposer un échange rapide et facile de plasmides entre des souches bactériennes différentes évoluant dans le même foyer.

De même, la présence de bandes communes entre les souches ne signifie pas qu'elles possèdent la même séquence puisque des séquences différentes de l'ADN peuvent avoir la même taille.

2. Analyse des profils d'hybridation

Ces profils confirment les résultats obtenus avec les profils restrictifs, quoique certaines similarités de profil plasmidique aient été identifiées.

Par exemple, des profils plasmidiques identiques ont été révélés pour les souches 11 et 15, d'une part et 1 et 10, d'autre part (Figure 2). Ces souches ayant la même origine et les mêmes antibiotypes semblent être identiques.

La sonde de 2 kb a été obtenue à partir de la souche 11. Elle s'est hybridée avec presque tous les plasmides des souches étudiées, indiquant la présence de relations entre ces plasmides.

Par ailleurs, cette sonde s'est hybridée avec l'ADN chromosomique de la plupart des souches en l'occurrence la souche 7 qui ne présentait pas de plasmide. La variation dans l'intensité des bandes est due à la présence d'un nombre de copies différents de fragments plasmidiques.

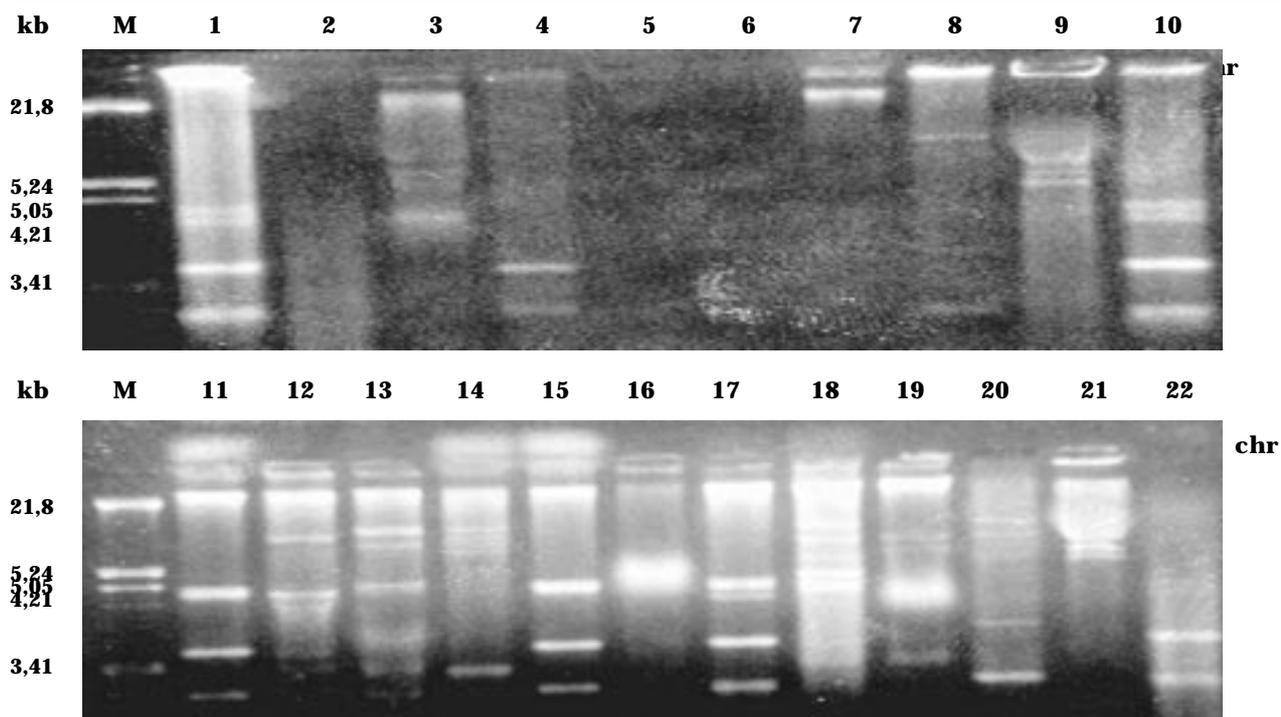


Figure 1. Électrophorèse sur gel d'agarose horizontal de l'ADN plasmidique digéré par EcoR I
M : Marqueur moléculaire, phage lambda digéré par EcoR I/Hind III ; chr, ADN chromosomique

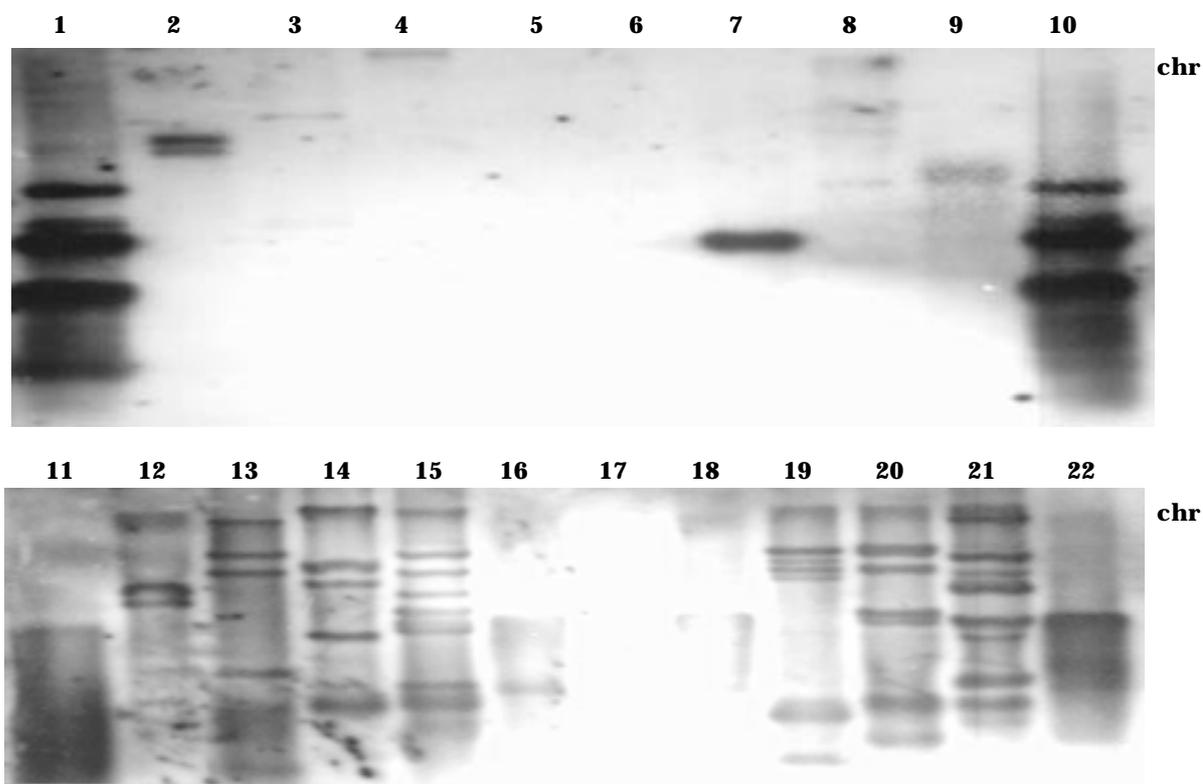


Figure 2. Autoradiogramme des profils EcoR I, obtenus par hybridation de l'ADN plasmidique digéré (Figure 1) avec la sonde d'ADN plasmidique de 2 kb

DISCUSSION

Le profil natif d'ADN extrachromosomique des souches d'*E. coli* suggère la présence de plusieurs plasmides. Il est difficile de déterminer le nombre ainsi que la taille des plasmides à cause de leurs formes (surenroulée, circulaire relâchée, linéaire et concatémère). Ces différentes formes se traduisent par des profils électrophorétiques complexes qui peuvent aussi varier selon les conditions de cultures et d'électrophorèse (Krivnogov, 1984).

Pour s'affranchir de ce paramètre, on a procédé à la digestion de ces plasmides. Les profils restrictifs obtenus ont montré une grande diversité du contenu plasmidial des souches d'*E. coli* (Bakkali Yakhlef *et al.*, 2000). Toutefois, les plasmides de résistance peuvent varier de taille par insertion ou délétion des transposons (Mitsuhashi, 1977).

D'autre part, des plasmides du même groupe d'incompatibilité peuvent varier de taille et de séquence de résistance comme les trois plasmides du groupe IncFII (R1, R6, et R100) (Sharp *et al.*, 1973) qui dérivent d'espèces bactériennes très éloignées géographiquement.

Aussi, on s'est proposés d'analyser ces plasmides et démontrer la relation existante entre eux, et ce par hybridation de leurs ADN avec une sonde d'origine plasmidique extraite de l'une des souches étudiées.

Les résultats des hybridations avec la sonde de 2 kb ont montré la conservation de cette séquence d'ADN parmi tous les plasmides des souches testées. Ces plasmides pourraient donc appartenir au même groupe d'hybridation.

Par ailleurs, cette sonde s'est hybridée avec l'ADN chromosomique de certaines souches en l'occurrence avec celle des souches multirésistantes et ne présentant pas de plasmides. Ceci suppose la présence de gènes de résistance sur le chromosome bactérien. En effet, la plupart des gènes de résistance sont portés par des éléments génétiques transposables (Grinsted, 1986) qui peuvent sauter d'un réplicon (plasmide ou chromosome) sur un autre (transposition intermoléculaire) ou en un autre site du même réplicon (transposition intramoléculaire) (Brown & Blowers, 1978). Ceci pourrait expliquer la diversité génétique de ces plasmides bien qu'ils possèdent une grande homologie de séquence.

CONCLUSION

La technique d'hybridation moléculaire a montré la présence d'une grande homologie de séquence entre tous les plasmides des souches étudiées. Ceci indique l'appartenance de ces plasmides au même groupe d'hybridation. Pour confirmer ces résultats, des tests d'incompatibilité doivent être réalisés afin de clarifier les relations existantes entre les plasmides, ainsi que l'utilisation de l'ADN des gènes de résistance transposables comme sonde pour connaître la construction modulaire de ces plasmides.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Amara A. (1996) Données épidémiologiques et épizootiologiques sur les colibacilloles aviaires au Maroc. *Maghreb Vétérinaire* 8 (32)
- Anonyme (1993) Technique des disques par diffusion en gélose. AntibioGramme Pasteur. *Diagnostic Pasteur* 1989, 1993
- Bakkali Yakhlef S-E., Assali N-E., Amara A. & Belabed A-M. (2000) Caractérisation des profils plasmidiques des souches d'*Escherichia coli* aviaires antibiorésistantes. *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)* 20(1) : 5-11
- Birmboin H.C. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7 : 1513- 1523
- Boehringer Mannheim Biochemica (1993) The DIG system user's guide for filter hybridization: 90 p.
- Brown D. & Blowers R. (1978) Disc methods of sensitivity testing and other semiquantitative methods. In Reeves D.S., Phillips I., Williams J.D. & Wise R. (Eds.), Churchill Livingstone, London et New York
- Datta N., Hedges R.W., Shaw F.J. Sykes R.P. & Richmond M.H. (1971) Properties of an R-Factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 108 : 1244-1249
- Grinsted J. (1986) Evolution of transposable elements. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (suppl) : 77-83
- Krivnogov S.V. (1984) The rec F dependent endonuclease from *Escherichia coli* k-12 formation and resolution of pBR322 DNA multimers. *Mol. Gen. Genet.* 169 : 105-109
- Linton A.H. (1982) Problèmes de résistance des animaux domestiques aux antibiotiques. *Pro. Veterinario* 3 : 3-12

- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J. (1982) Molecular cloning : a laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.
- Mitsuhashi S. (1977) Translocable drug resistance determinants. *In* R factor : drug resistance plasmids. Edited by S. Mitsuhashi. University Park Press, Baltimore, Md. pp. 73-87
- Sharp P.A., Cohen S.N. & Davidson N. (1973) Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. II. Structure of drug resistance (R) factors and F factors. *J. Mol. Biol.* 75(2) : 235-255
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 28 : 503-517
- Steen R. & Sköld O. (1985) Plasmid - borne or chromosomally mediated resistance by Tn7 is the most common response to ubiquitous use of trimethopim. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 933-937
- Whiteman C.E. & Bickford A.A. (1983) Colibacillosis. *In* Avian disease manual. 2nd ed., The american association of avian pathologists, Pennsylvania