

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE DOCTORALE

SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE



Année: 2013

N° d'ordre: 56

THESE DE DOCTORAT

Spécialité:

BIOLOGIE ET PATHOLOGIES HUMAINES

Etude du microbiote digestif sénégalais: détection et caractérisation des pathogènes entériques

Présentée par

Bissoume Sambe Ba

Soutenue

le 04/12/2013 à 16 heures devant le jury composé de:

<u>Président:</u>	Cheikh Saad-Bouh BOYE	Professeur (FMPOS)
<u>Rapporteurs:</u>	Coumba TOURE KANE	Professeur (ESP)
	Mbacké SEMBENE	Professeur (FST)
<u>Examineurs:</u>	Mady NDIAYE	Professeur (FST)
	André SPIEGEL	Professeur (IPD)
<u>Directeur de thèse:</u>	Amy GASSAMA SOW	MCA, chargée de recherche (ESP, IPD)

A NOS MAITRES ET JUGES

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar sous la direction de Mme Amy GASSAMA SOW, Maître de Conférences Agrégé et chargée de Recherche à l'Institut Pasteur de Dakar. Nos sincères remerciements:

- ★ Au professeur Amy GASSAMA SOW, responsable de l'Unité de Bactériologie Expérimentale (UBE) et du Laboratoire de Sécurité Alimentaire, de l'Hygiène et de l'Environnement (LSAHE), directrice de ce mémoire. Vous nous avez acceptés dans votre laboratoire, vous avez guidé nos premiers pas dans la recherche et mis à notre disposition tous les moyens nécessaires. Vous avez désigné et dirigé ce travail qui est le vôtre jusqu'à terme. Votre rigueur, votre attention à notre égard, votre disponibilité à répondre à nos questions et votre humilité nous ont toujours marqués. Nous vous en remercions très sincèrement.

- ★ Au professeur Cheikh Saad-Bouh Boye, Malgré vos responsabilités vous avez accepté de présider le jury et de juger notre modeste travail. Nous vous présentons notre profonde reconnaissance.

- ★ Au professeur Mady Ndiaye, vous avez énormément participé à notre formation à l'UCAD depuis la première année. Vous nous avez toujours fascinés par votre rigueur et la clarté de vos enseignements. Vos qualités humaines sont sans faille. Nous vous remercions d'avoir examiné ce travail.

- ★ Au professeur Coumba Touré Kane, pour avoir accepté de rapporter cette thèse. Malgré vos responsabilités et votre calendrier très chargé, vous avez accepté de juger notre modeste travail et de siéger dans le jury. Retrouvez ici toute notre gratitude.

- ★ Au professeur Mbacké Sembène, pour avoir accepté de rapporter cette thèse. Vous avez toujours participé dans notre formation. Votre disponibilité constante, votre rigueur scientifique et vos qualités humaines forcent l'admiration de tous.

- ★ Au professeur André Spiegel, Administrateur Général de l'Institut Pasteur de Dakar, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Votre engagement, votre rigueur scientifique, votre disponibilité nous ont beaucoup inspiré. Retrouvez ici toute notre reconnaissance.

- ★ Au professeur Omar Thiom Thiaw, la direction de la Coopération Universitaire de l'UCAD, tous nos enseignants de la faculté des Sciences et Techniques.

- ★ Au professeur Oumar Gaye, chef du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la faculté de Médecine, directeur de la formation doctorale Biologie et Pathologies Humaines, vos qualités humaines et le soutien que vous accordez aux étudiants de la formation doctorale nous ont marqué profondément. Recevez ici toute notre reconnaissance.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont à l'endroit du personnel de l'Unité de Bactériologie Expérimentale: Abdoul Aziz Wane, Ingénieur de recherche qui m'a beaucoup aidée dans la réalisation technique de ce travail. Je remercie particulièrement Amadou Makhtar GUEYE et tous les étudiants Lassina Gadi Timbiné, Ndèye Khote Fall étudiants en thèse, Elimane Faye, Ayan et Dr Aïssatou Niang. Vos conseils, votre disponibilité et vos qualités humaines m'ont marquée énormément. Je vous exprime toute ma reconnaissance. Je remercie tout le mouvement étudiantin de Pasteur Dakar.

Je remercie Dr Abdoulaye Seck, pharmacien biologiste et tout le personnel du Laboratoire de Biologie Médicale et le personnel du LSAHE de l'Institut Pasteur de Dakar. Je remercie la direction de l'Institut Pasteur de m'avoir accueillie dans ce remarquable établissement.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur, des Universités, des Centres Universitaires Régionaux et de la Recherche Scientifique pour le soutien financier à travers le Fonds d'Impulsion de la Recherche Scientifique et Technique [FIRST] pour la mise en œuvre de ce projet de recherche.

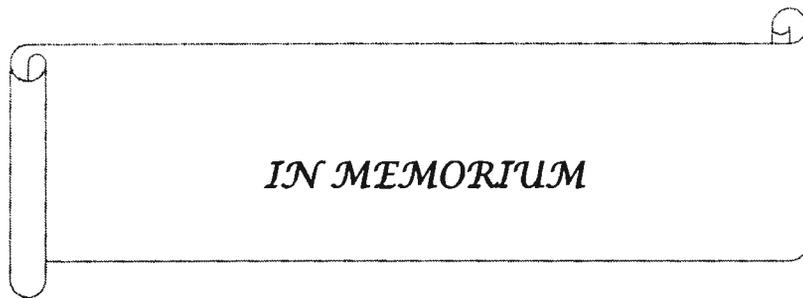
Je remercie aussi tout le personnel de l'Unité d'Epidémiologie pour le travail abattu dans la réalisation de ce projet de recherche particulièrement Dr Alioune Badara Ly, Dr Adama Tall et mention spéciale à Dr Emmanuelle Espié pour ses analyses statistiques pertinentes. Je remercie Mr Joseph Faye pour la réalisation du formulaire d'enquête et d'analyse.

Mes remerciements vont à l'endroit de tout le personnel des laboratoires des structures de santé incluses dans cette étude. Vous m'avez apporté votre soutien dans le recrutement des échantillons. Votre apport technique, moral et votre hospitalité m'ont profondément touchée.

Je remercie l'Ambassade de France au Sénégal à travers U3E qui m'a fait bénéficier de la bourse de stage en France.

Je remercie exceptionnellement Pr Didier Raoult, directeur de l'Unité de Recherche des Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes (URMITE) de Marseille et IRD-Dakar. Vous m'avez accueillie chaleureusement dans votre unité à Marseille et m'avez offert l'occasion de découvrir de nouvelles techniques de recherche, grâce aux stages que vous m'avez accordés et la prise en charge de mon séjour. Soyez en remerciés. Je remercie Dr Florence Fenollar pour son encadrement et tout le personnel du laboratoire de Fédération de Microbiologie de l'hôpital Timone et de l'Unité des Rickettsies de la faculté de médecine de Marseille.

Je remercie le Médecin-Général Boubacar Wade, directeur de l'hôpital Principal de Dakar, Dr Yaya Diémé, Chef de la Fédération des laboratoires, Dr Bécaye Fall chef du service de biologie, , Dr Yankhoba Diop chef du service de l'anatomopathologie, Dr Kowry Sow Ndiaye, Dr Papa Silman Diawara, Dr Mamadou Wagué Gueye et tout le personnel du laboratoire pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé.



A mon très cher papa. Tu nous a quittés au mois béni de Ramadan 2013. Que la baraka de ce mois t'accompagne dans ta dernière demeure. Tu t'es toujours sacrifié pour la réussite de tes enfants

Tu es et tu resteras toujours dans notre vie

Que la terre te soit légère et que le Tout Puissant t'accueille dans son paradis.

A ma grande sœur aînée Seyni Ndiaye, à ma tante Fama Niang, à ma belle mère Bamby Diop. Que Dieu les accueille dans son paradis.

DEDICACES

Je dédie ce travail à tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à son élaboration.

A mon mari et très cher ami, Dr Pape Yakhya Ba qui m'a toujours soutenue. Merci pour ta compréhension, ton amour et ton soutien tout au long de ce travail qui est aussi le tien.

A mes enfants, Aissatou Thioro, Ndèye khady et ma petite Bamby, vous avez supporté mes absences avec beaucoup de courage. Recevez ici toute mon affection et mon estime. Puisse ce travail vous inspirer dans la réussite de votre vie.

A ma mère Oulimata Diégou Ngom, tu t'es toujours investie pour la réussite de tes enfants. Que Dieu t'accorde longue vie et qu'il te donne la santé nécessaire pour savourer les fruits de tes sacrifices.

A ma belle famille particulièrement père Démba Diallo et Tata Amy Ba, vous m'avez toujours soutenue. Ce travail est le vôtre.

A Mme Boiro Pénda Ndoye et famille pour le soutien que tu m'apportes en gardant mes enfants pendant mes absences. Que Dieu te récompense.

A toute ma famille, ma petite sœur Coumba, kène, son mari Abdou Guissé, Mr et Mme Abdalah Diallo, Amadou Mbaye Guissé et à tous mes amis, Mme Thioro Kambi, Dr Fallou Thiane, Mr Bathie Mbaye, Mr et Mmes Omar Kambi, Mr et Mme Omar Seck de Eiffage Sénégal, Mr et Mme Coly Seck, directeur de cabinet du ministère des Affaires Etrangères.

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapître I: Généralites	5
1. Le microbiote digestif humain	6
2. Composition	6
3. Fonction	6
4. La diversité du microbiote digestif	7
5. Les méthodes de caractérisation	7
6. L'analyse moléculaire	8
7. La culture	8
8. La spectrométrie de masse MALDI-TOF	9
9. Les dysfonctionnements du microbiote digestif intestinal	10
9.1. Obésité	10
9.2. Maladie de Crohn	10
9.3. Diabète de type II	11
9.4. Diarrhée	11
9.5. Diarrhées parasitaires	12
9.5.1. Les Protozoaires	12
9.5.1.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	12
9.5.1.2. <i>Giardia lamblia</i>	14
9.5.1.3. <i>Cryptosporidium</i>	15
9.5.1.4. <i>Microsporidium</i>	16
9.5.2. Les Helminthes	17
9.5.2.1. <i>Ascaris lumbricoïdes</i>	17
9.5.2.2. <i>Trichuris trichiura</i>	18
9.5.2.3. <i>Enterobius vermicularis</i>	19
9.5.3. Les Trématodes	19
9.5.3.1. <i>Schistosoma mansoni</i>	19
9.6. Diarrhées virales	20
9.6.1. Rotavirus	21

9.6.2. Adenovirus	22
9.6.3. Calicivirus	22
9.6.4. Enterovirus	23
9.6.5. Astrovirus	23
9.7. Diarrhées bactériennes	24
9.7.1. Les shigelloses.....	24
9.7.2. Les salmonelloses.....	26
9.7.3. Les entérites à Escherichia coli	27
9.7.4. Le choléra.....	30
9.7.5. Les campylobactérioses.....	31
9.7.6. Les yersiniooses	32
10. Traitement.....	33
11. Les antibiotiques.....	33
11.1. Les bêta-lactamines.....	33
11.2. Les glycopeptides.....	34
11.3. Les aminosides.....	34
11.4. Les phénicolés.....	34
11.5. Les tétracyclines.....	35
11.6. Les sulfamides et associations	35
11.7. Les macrolides, lincosamides et streptogramines	35
11.8. Les Quinolones et fluoroquinolones	35
12. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	36
13. Types de résistance	37
13.1. Résistance naturelle.....	37
13.2. Résistance acquise.....	37
13.3. Modalités de résistance chez la bactérie	37
13.3.1. Le camouflage	37
13.3.2. Le brouillage.....	37
13.3.3. Le blindage	38
13.3.4. L'esquive	38

13.3.5. La constitution en biofilm	38
13.4. Transfert des gènes de résistance	38
13.5. Les modes de transfert	38
13.5.1. Le transfert vertical	38
13.5.2. Le transfert horizontal	38
13.6. Les mécanismes de transfert	39
13.6.1. La transduction	39
13.6.2. La transformation	39
13.6.3. La conjugaison	39
13.7. Dissémination de la résistance	40
13.7.1. Le chromosome	40
13.7.2. Les plasmides	40
13.7.3. Transposons.....	41
13.7.4. Les intégrons	43
13.7.4.1. Structure des intégrons	44
13.7.4.2. Structure des cassettes	44
13.7.4.3. Mouvement des cassettes.....	45
13.7.4.4. Expression des cassettes	46
13.7.4.5. Les principales classes d'intégrons.....	47
a) Les intégrons de classe 1.....	47
b) Les intégrons de classe 2	48
c) Les intégrons de classe 3.....	50
d) Les Super-intégrons	51
13.7.4.6. Origine des intégrons.....	52
13.7.5. Ilôts génomiques de résistance	53
Chapître II: Travail Expérimental	54
I. Présentation détaillée du travail de thèse	55
1. Aspects éthiques	57

2. Population d'étude	57
3. Critères d'inclusion.....	57
4. Critères d'exclusion	57
Etude 1: Analyse du microbiote digestif sénégalais	58
II. Patients, Matériels et Méthodes	59
1. Matériels	59
1.1. Prélèvements de selles	59
1.2. Données épidémiologiques	60
1.3. Données cliniques	60
1.4. Autres matériels (voir en annexe)	61
2. Méthodes.....	61
2.1. Milieux de culture	62
2.2. Méthodes de culture	62
2.3. Le spectromètre de masse MALDI-TOF	64
2.4. Séquençage de l'ARN 16S	65
Etude 2: Etude étiologique des diarrhées infectieuses et caractérisation des pathogènes entériques	67
III. Matériels et Méthodes	68
1. Matériels	68
1.1. Prélèvements de selles	68
1.2. Autres matériels (voir en annexe)	68
2. Méthodes.....	68
2.1. Examen parasitologique des selles.....	69
2.1.1. Examen macroscopique.....	69
2.1.2. Examen microscopique	69
2.2. Examen virologique	69
2.3. Examen bactériologique.....	70
2.3.1. Examen macroscopique.....	70
2.3.2. Examen microscopique	70
2.3.3. Coproculture.....	71
2.3.4. Antibiogramme.....	72
2.3.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	73

2.3.6. Sérotypage	73
2.4. Procédés moléculaires	73
2.4.1. Extraction d'ADN total	73
2.4.2. Extraction d'ADN génomique.....	74
2.4.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	75
2.4.3.1. Définition.....	75
2.4.3.2. Principe	75
2.4.3.3. Technique	76
2.4.3.4. Analyse du produit d'amplification	77
2.4.4. Recherche des gènes de résistance	77
2.4.5. Détection des intégrons	78
2.4.6. Caractérisation des intégrons.....	78
2.4.6.1. Caractérisation des intégrons de classe 1.....	78
2.4.6.2. Caractérisation des intégrons de classe 2.....	79
2.4.7. Recherche de facteurs de virulence	79
2.4.8. Le clonage	79
2.4.8.1. Principe	79
2.4.8.2. Technique	79
2.4.9. Le séquençage	81
2.4.9.1. Principe	81
2.4.9.2. Technique	81
2.4.10. PFGE	83
2.4.10.1. Principe	83
2.4.10.2. Technique	83
IV. Résultats.....	86
1. Données épidémiologiques.....	87
2. Les analyses statistiques	87
3. Population d'étude	87

4. Culture microbienne	87
5. Résultats sur les étiologies des diarrhées infectieuses	92
5.1. Données cliniques des patients	92
5.2. Données épidémiologiques	92
5.3. Analyses descriptives sur la population présentant une diarrhée.....	92
5.4. Aspect des selles	95
5.5. Analyses descriptives des patients n'ayant pas pris d'antibiotiques.....	95
6. Analyse microbiologique.....	98
6.1. Agents parasitaires retrouvés	98
6.2. Agents viraux retrouvés	98
6.3. Agents bactériens pathogènes	100
6.4. Bactéries pathogènes non spécifiques.....	102
7. Phénotypes de résistance	102
8. Les concentrations minimales inhibitrices CMI.....	103
9. Les résistances chez <i>Shigella</i>	103
10. Les résistances chez <i>Salmonella</i>	104
11. Les résistances chez les autres espèces bactériennes.....	105
12. Les facteurs de virulence	106
13. Les résistances chez <i>Escherichia coli</i> pathogène	108
14. Caractérisation moléculaire	108
14.1. Les gènes de résistance	108
14.2. Les intégrons.....	112
V. Discussion	114
Conclusion Générale et Perspectives	130
Références Bibliographiques	133
Annexes	144

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Kyste d' <i>Entamoeba histolytica</i> , Sarfati, 2008	13
Figure 2 : Formes végétatives ou trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i> , Sarfati, 2008.....	13
Figure 3 : Formes végétatives de <i>Giardia lamblia</i> , Sarfati, 2008	15
Figure 4 : Oocyste sporulé de <i>Cryptosporidium</i> (cours de Parasitologie 2008-2009)	16
Figure 5 : Oocystes d' <i>Encephalitozoon intestinalis</i> : coloration de Trichome Weber et de chromotrope 2 R (source ANOFEL).....	17
Figure 6 : Œuf d' <i>Ascaris lumbricoides</i> Source : Parasitologie Mycologie. CHU Nancy (François et al, 2004).....	17
Figure 7 : Œuf de <i>Trichuris trichiura</i> (trichocéphale) Parasitologie Mycologie. CHU Nancy (François et al, 2004).....	18
Figure 8 : Œufs embryonnés d' <i>Enterobius vermicularis</i> (oxyure). Source : Parasitologie. Faculté Médecine Necker, Paris. Pays J.F. (François et al 2004).	19
Figure 9 : Œufs de <i>Shistosoma mansoni</i> Source : Parasitologie. Faculté Médecine Necker, Paris. Pays J.F. (François et al 2004).	20
Figure 10 : Structure d'un Rotavirus (Microscopie Electronique URMITE Marseille)	21
Figure 11 : Structure d'un Adenovirus (Microscopie Electronique URMITE Marseille)	22
Figure 12 : Structure de Calicivirus (Microscopie Electronique URMITE Marseille).....	23
Figure 13 : Structure d'un Enterovirus (Microscopie Electronique URMITE Marseille)	23
Figure 14 : Région 5' conservée des intégrons (Stockes 1989)	44
Figure 15 : Structure d'une cassette (Recchia 1997).....	45
Figure 16 : Insertion-excision des cassettes (Collis 1992)	46
Figure 17 : Structure des trois principales classes d'intégrons de résistance	47
Figure 18 : Intégron de classe hybride (Ploy 2000)	49
Figure 19 : Maps of the integron regions in Tn7 and in the related transposons Tn1825 and Tn1826 (Hanson 2002).....	50
Figure 20 : Mécanismes d'insertion et d'excision des cassettes de l'intégron de classe 3 (Correia 2003)	51
Figure 21 : Représentation sur la carte des sites d'étude (régions)	61

Figure 22 : Appareil MALDI-TOF type Microflex (Bruker).....	64
Figure 23 : Schéma montrant les différentes phases de la PCR.....	76
Figure 24: Espèces bactériennes pour lesquelles des différences significatives ont été observées entre les patients souffrant de diarrhée et ceux sans.....	91
Figure 25 : Répartition des patients par zones d'étude	94
Figure 26 : Répartition mensuelle des patients par classes d'âge.....	95
Figure 27 : Répartition des parasites retrouvés	98
Figure 28 : Répartition des étiologies virales.....	99
Figure 29 : Répartition des bactéries pathogènes isolées	100
Figure 30 : Profil de résistance de <i>Shigella</i> vis à vis des antibiotiques.....	104
Figure 31 : Profil de résistance de <i>Salmonella</i> vis à vis des antibiotiques.....	105
Figure 32: Photo de gel de la PCR du gène <i>eae</i> chez <i>E.coli</i>	106
Figure 33: Photo de gel des gènes <i>SLT1</i> et <i>SLT2</i> de souches <i>E.coli</i>	107
Figure 34 : Profil de résistance des pathotypes de <i>E.coli</i>	108
Figure 35: Photo de gel du gène <i>bla_{tem1}</i> chez des souches de <i>Shigella</i>	110
Figure 36: Photo de gel des gènes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i> souches <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> NalR.....	110
Figure 37: Photo de gel de gènes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> et <i>qnrS</i>	111
Figure 38: Photo de gel de la PCR <i>int2</i> de la souche <i>E.coli</i> NalR	113

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Différents milieux de culture utilisés	62
Tableau II : Amorces utilisées pour la PCR 16S rRNA et le séquençage.....	66
Tableau III : Répartition de la population étudiée.....	92
Tableau IV : Patients présentant une diarrhée.....	92
Tableau V: Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des 241 patients atteints de diarrhée, de 2009 à 2010.	96
Tableau VI : Pourcentage des virus chez les enfants	99
Tableau VII : Bactéries pathogènes spécifiques.....	101
Tableau VIII : Bactéries pathogènes non spécifiques	102
Tableau IX : Détermination des CMI chez <i>Shigella</i> et <i>Salmonella</i>	103
Tableau X : Différents facteurs de virulence de <i>Escherichia coli</i>	107
Tableau XI : Répartition des gènes de résistance aux quinolones selon les souches.....	111

SIGLES et ABBREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ANOFEL : Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicale (Anofel http://www.med.univ-angers.fr/service_serveur/invite/anofel/)

ANSD: Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie

API 20 E: Appareils et Procédés d'identification biochimiques des Entérobactéries

API 20NE: Appareils et Procédés d'identification biochimiques des non Entérobactéries

ARN: Acide ribonucléique

Asp: aspartate

BCP: Bromo-Crésol-Pourpre

BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract

BET: Bromure d'éthidium

BGN: Bacille à Gram négatif

BLSE: bêta-lactamase à spectre étendu

CASFM: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CMI: concentration minimale inhibitrice

CNSE: Centre National Sénégalais des Entérobactéries

CRISPR: Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat

ELISA: Enzyme Linked Sorbent Immuno Assay

IMC: indice de masse corporelle

LAMVAB: Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

MICI: Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MIF: Merthiolate Iodine

Mq: marqueur de taille

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ONPG: *Ortho*-Nitrophenyl- β -galactoside

PAI SRL: Pathogenicity island on *Shigella* resistance locus (SRL)

PAR: *Pseudomonas alcaligenes* repetitive DNA

PCR: Polymerase chain reaction

PED : Pays en voie de développement

PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis

Pb: paire de base

Thr: thréonine

UV: ultra violet

VCR: *Vibrio cholerae* repeated sequence

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

WHO: World Health Organization

Introduction

Introduction

Le microbiote digestif humain est un exemple de biodiversité: il concerne 10^{14} microorganismes, soit 10 fois le nombre de cellules somatiques et germinales qui nous composent, un pool de gènes 100 fois supérieur au génome humain, environ 1000 espèces, et une activité métabolique égale à celle du foie. Il a été rapporté que son métagénome contenait 100 fois plus de gènes que le génome entier humain (Turnbaugh 2007). La culture a été le premier moyen d'exploration de l'écosystème bactérien digestif puis la PCR, le clonage et le séquençage du gène de l'ARNr 16S ont révolutionné la caractérisation des communautés microbiennes notamment du microbiote digestif. L'intérêt de telles méthodes est particulièrement l'identification de nouvelles séquences puisque selon l'étude pionnière de Eckburg et al (Eckburg 2005), 62% des phylotypes bactériens étaient nouveaux et 80% représentaient des séquences d'espèces n'ayant jamais été cultivées. Cependant, ces méthodes sont longues et coûteuses. Récemment, de nouvelles méthodes ont été mises au point, basées sur la technologie des microarrays mais elles ne tiennent pas compte de nouvelles séquences. Tout récemment, une méthode de spectrométrie de masse appelée MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) est utilisée pour détecter les bactéries à travers leur contenu protéique (Seng 2009). L'utilité du MALDI-TOF est aujourd'hui certifiée dans les laboratoires cliniques. Les banques de données ont rapidement évolué et permettent d'identifier aussi bien des bactéries, des champignons, levures, que des virus. Le spectromètre de masse MALDI-TOF est une approche qui a révolutionné le monde de la microbiologie. Le rôle du microbiote digestif dépasse le métabolisme énergétique et la régulation du stockage des graisses (Bäckhed 2005) et intervient notamment dans le développement de l'immunité. Les bactéries digestives représentent entre 10^{11} à 10^{12} cellules/g de selles par des méthodes traditionnelles (chambre de Petroff-Hausser) (Savage 1977), ce qui correspond à 60% de la masse des matières fécales sèches (Stephen 1980). Plusieurs pathologies sont associées au microbiote digestif: l'ulcère chronique, la colite ulcéreuse, la maladie de Crohn, le diabète, le cancer colorectal, l'obésité, les diarrhées associées aux antibiotiques ou liées au déséquilibre de la composition de la flore bactérienne digestive.

Les maladies diarrhéiques constituent un problème de Santé Publique dans les pays en voie de développement. Selon l'OMS il survient 1,3 milliards d'épisodes de diarrhées chaque année chez 500 millions d'enfants avec une moyenne de 3,3 épisodes par enfant. Les diarrhées entraînent chaque année 3 millions de décès, en particulier chez les enfants de moins de cinq ans (Guerrant 2002) et 80% de ces décès concernent les enfants de moins de deux ans. Malgré

Introduction

les réels progrès dans le domaine de la prévention, des traitements, le développement des vaccins et l'amélioration des conditions de vie, elles demeurent la principale cause de mortalité dans le monde. Il y a environ 1,7 milliard de cas de diarrhée chaque année dans le monde tuant environ 760000 enfants (OMS 2013). Dans les pays en développement, ces maladies constituent la troisième cause de décès chez les enfants de moins de 5 ans et la première cause de mortalité infantile liée à la déshydratation (OMS 2005). Les diarrhées sévissent en Afrique subsaharienne de façon endémique; elles y représentent 37 % de l'ensemble des cas de diarrhées observés dans le monde, constituent la cause d'un quart de l'ensemble des maladies infantiles qu'on y enregistre et 15 % des consultations ou hospitalisations (OMS 2005). Le Sénégal est classé dans le deuxième groupe des pays africains ayant une prévalence comprise entre 15 et 20 %, mais rangé dans la troisième catégorie des pays pour lesquels la morbidité ne représente pas de différence sensible entre le milieu urbain (14,1%) et rural (14,3%) (Ngwe 2007). La répartition des agents pathogènes varie selon l'environnement. Ainsi, les climats tropicaux favorisent les étiologies bactériennes et parasitaires (Imbert 2001). Les bactéries entéropathogènes les plus couramment rencontrées sont: *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* pathogènes et *Vibrio cholerae* O1. Les virus peuvent aussi être des agents responsables de diarrhée notamment le Rotavirus chez les jeunes enfants. Bien que certains d'entre eux soient cosmopolites, la prévalence varie d'une région à l'autre. Cette variation est due à différents facteurs environnementaux, socio-économiques et/ou ceux liés aux habitudes alimentaires de la population. Le pouvoir pathogène de ces germes est aussi très variable allant du simple portage asymptomatique à des tableaux symptomatiques gravissimes, voire mortels. La détection de ces agents pathogènes chez l'homme est le reflet du niveau d'hygiène alimentaire et fécale et de la salubrité de l'eau de boisson. L'antibiothérapie est indiquée dans les cas de diarrhées bactériennes et accompagnée d'une réhydratation orale. Cependant cette antibiothérapie se heurte au problème de l'antibiorésistance observée de plus en plus chez les bactéries entériques. Le développement de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes constitue un problème majeur de Santé Publique dans les pays en voie de développement. Les agents antimicrobiens ont sensiblement réduit la menace posée par les maladies infectieuses. Leur utilisation a conduit au fil des années à une baisse spectaculaire des décès liés à des maladies transmissibles autrefois très répandues, incurables et souvent mortelles. Ces acquis sont aujourd'hui gravement menacés par l'émergence et la dissémination de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques.

Introduction

Au cours des dernières décennies, l'utilisation irrationnelle des antibiotiques, l'automédication erronée, la vente anarchique de médicaments en dehors des structures légales, l'insuffisance des activités de surveillance de la forte pression de sélection antibiotique entre autres ont favorisé l'antibiorésistance.

Par ailleurs, les antibiotiques utilisés initialement en pathologie humaine en traitement curatif ont vu leur utilisation détournée pour être abusivement employés comme additif alimentaire afin de stimuler la croissance des animaux (Roy 1997).

Peu d'études ont été réalisées dans les pays tropicaux sur les causes de ces diarrhées où certaines étiologies sont endémiques (Reither 2007). Au Sénégal, des études ont été menées à Dakar (Gassama 2001) dans le but d'identifier les étiologies des diarrhées infectieuses, mais elles se sont limitées à deux centres hospitaliers; dans notre étude, nous nous proposons d'étudier la prévalence et les étiologies des diarrhées infectieuses dans huit structures de santé. Les bactéries isolées lors de cette étude feront l'objet d'une caractérisation phénotypique (biotypie, sérotypie, antibiotype) et génotypique (typage moléculaire des bactéries, étude des marqueurs de la résistance et des mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques).

Les objectifs généraux ciblés dans ce travail sont de:

- Etudier la composition du microbiote digestif du sénégalais
- Etudier la prévalence des diarrhées infectieuses à Dakar
- Déterminer les étiologies des diarrhées infectieuses à Dakar
- Evaluer la fréquence des résistances bactériennes aux antibiotiques des souches isolées

Les objectifs spécifiques sont de :

- - Identifier et déterminer les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des pathogènes entériques isolés classiques et ceux non répertoriés
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes isolées
- Etudier les mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques chez les souches multirésistantes.



Chapitre I : Généralités

1. Le microbiote digestif humain

Le microbiote est l'ensemble des micro-organismes (c'est-à-dire champignons, archae, virus et bactéries) dans un environnement spécifique (appelé microbiome) (Finegold 1974). Cette population diversifiée constitue un écosystème vivant en accord avec son hôte. Le microbiote digestif humain (le plus étudié) est un exemple de biodiversité. Son importante diversité a déjà été décrite comme « super organisme » biologique. Il a été rapporté que son métagénome contenait 100 fois plus de gènes que le génome entier humain (Turnbaugh 2007).

2. Composition

La composition de la flore s'acquiert pendant les deux premières années de vie. Cette flore est mature à l'âge de 2 à 4 ans. A la naissance, le tube digestif est stérile. La colonisation commence à l'accouchement et dépend du mode d'accouchement, de l'alimentation, de l'état de santé, de l'antibiothérapie et de l'environnement (<http://www.ifn.asso.fr>). La composition du microbiote est variable selon l'âge mais aussi selon les individus, les habitudes alimentaires et le segment digestif concerné. Finegold rapportait dès 1975 que cet écosystème complexe, consistant en un ensemble de bactéries, d'archae, de levures et de champignons filamenteux est majoritairement localisé dans l'intestin, plus précisément au niveau du côlon où l'on dénombre jusqu'à 10^{12} micro-organismes par gramme de contenu (chambre de Petroff-Hausser). Le microbiote digestif de l'enfant diffère de celui de l'adulte et est attributaire de la situation géographique où vit l'individu. Chaque individu héberge une diversité d'espèces qui lui est propre, dépendant d'interactions complexes hôte-bactéries, et qui reste relativement stable au cours de sa vie.

3. Fonction

Les fonctions du microbiote intestinal sont multiples et bénéfiques pour l'hôte : de part ses réactions enzymatiques, il joue un rôle important dans l'homéostasie, le métabolisme, la synthèse de micronutriments, la détoxification, le développement épithélial, et les fonctions immunitaires (Suau A 1999). Une des activités principales est l'extraction des calories de la nourriture ingérée «récolte énergétique» grâce au procédé de fermentation qui permet d'améliorer l'assimilation de polysaccharides indigestes et l'approvisionnement des acides gras à courtes chaînes. Il est aussi impliqué dans la production de vitamine K, les multiples vitamines B, du dihydrogène (H₂), du dioxyde de carbone (CO₂), du méthane (CH₄), de la lysine, et de la conversion de l'urée en ammoniacque. Le microbiote aide aussi à prévenir la colonisation par des bactéries pathogènes. (*Escherichia coli*, *Clostridium*, *Salmonella*,

Shigella) (Bäckhed 2005). En dépit de son rôle préventif, le microbiote est également à l'origine de certaines pathologies comme: l'ulcère chronique, la colite ulcéreuse, la maladie de Crohn, le diabète, le cancer colorectal, les diarrhées associées aux antibiotiques, et récemment l'on rapporte que la composition du microbiote digestif pourrait prédisposer à l'obésité (Ley 2006). Lors d'une diarrhée aiguë infectieuse, quel que soit l'agent pathogène, on note fréquemment une diminution des bactéries anaérobies. La normalisation du microbiote n'est observée que 2 à 3 mois après la disparition du trouble digestif.

4. La diversité du microbiote digestif

Des études basées sur l'inventaire moléculaire du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal ont montré que plus de 70 % des séquences étaient issues de bactéries non cultivées (Suau A 1999; Eckburg 2005). Près des deux tiers étaient spécifiques de chaque individu. Le microbiote digestif est représenté presque exclusivement par 5 phylas bactériens: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia. La composition du microbiote est conservée au niveau des phyla d'un individu à un autre et hétérogène en ce qui concerne les espèces (Zoetendal 1998). Les bactéries aérobies facultatives comme des entérobactéries, des entérocoques et des lactobacilles s'implantent en premier lieu, suivies des bactéries anaérobies strictes et microaérobies telles que *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*. À partir du milieu des années 1980, Carl Woese a révolutionné le domaine de la microbiologie grâce à des comparaisons phylogénétiques fondées sur les ARN ribosomiaux délimitant les trois branches principales de la vie (Woese 1977; Woese 1987). Aujourd'hui, les analyses fondées sur le séquençage des ARNr restent une méthode de microbiologie, utilisée non seulement pour étudier la diversité microbienne, mais aussi comme une méthode d'identification et de taxonomie moléculaire des bactéries au jour le jour (Amann 1995). Enfin, la définition du phylotype (ou espèce détectée par outils moléculaires) sur la base de séquences codant pour le gène de l'ARNr 16S a été et demeure une norme pour les études de diversité des microorganismes.

5. Les méthodes de caractérisation

Depuis quelques années, l'essentiel de nos connaissances concernant la composition qualitative et quantitative du microbiote reposait essentiellement sur la culture de ses constituants. Avant les méthodes moléculaires, le nombre d'espèces bactériennes du microbiote digestif était estimé à environ 400 par les méthodes de culture (Rajilic-Stojanovic 2007): grâce notamment à l'observation microscopique de la flore, il était avéré depuis

longtemps que les micro-organismes cultivables étaient minoritaires au sein de celle-ci. Ce sont en particulier les études basées sur l'analyse des séquences des gènes codant l'ARNr 16S qui ont apportés de nombreuses données concernant la partie non cultivable de la flore humaine. Mais notre compréhension du microbiote reste fragmentaire car la culture reste un élément indispensable à la caractérisation exhaustive des micro-organismes, et toutes les méthodes actuellement disponibles ne fournissent que le reflet des groupes dominants du microbiote. Il est représenté presque exclusivement par 5 phyla bactériens: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrumicrobia (Dethlefsen 2008). L'étude du microbiote digestif chez la souris a montré une prédominance de Firmicutes (60 à 80%) et de Bacteroidetes (20% à 40%). Etonnamment, bien que chaque individu possède un microbiote qui lui est propre, plus de 95% des séquences sont assignées seulement aux Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria. Les deux premiers phyla se partagent la grande majorité de l'écosystème (Suau A 1999; Eckburg 2005).

6. L'analyse moléculaire

Les analyses moléculaires permettent particulièrement l'identification de nouvelles séquences puisque selon l'étude pionnière de Eckburg et al, 62% des phylotypes bactériens étaient nouveaux et 80% représentaient des séquences d'espèces n'ayant jamais été cultivées (Turnbaugh 2007). Récemment, de nouvelles méthodes ont été mises au point, basées sur la technologie des microarrays (Palmer 2006; DeSantis 2007) mais elles ne tiennent pas compte de nouvelles séquences. C'est pourquoi il a été développé une méthode fondée sur le pyroséquençage 454 de la région hypervariable du gène de l'ARNr 16S pour la description des communautés microbiennes (Huse 2008) et du microbiote digestif (Andersson 2008). La modélisation *in silico* a démontré que la méthode décrit correctement les communautés microbiennes jusqu'au phylotype (Andersson 2008). Le pyroséquençage a été évalué en collectant 141 000 reads du microbiote intestinal du macaque rhésus. Les résultats ont montré une reproductibilité élevée de l'assignement phylogénétique, une similarité des types prédominants et du nombre relatifs de taxa en comparaison de ceux obtenus par la méthode de Sanger (McKenna 2008).

7. La culture

La culture a été le premier moyen d'exploration de l'écosystème bactérien digestif (Finegold 1974; Savage 1977) puis la PCR, le clonage et le séquençage du gène de l'ARNr 16S ont révolutionné la caractérisation des communautés microbiennes (Woese 1977) notamment du

microbiote digestif. Cependant, ces méthodes sont longues et coûteuses. Par ailleurs, il est habituellement admis que seulement environ 1% des bactéries terrestres peuvent être cultivées facilement in vitro (Vartoukian 2010) et il y a actuellement soixante et un phyla bactériens distincts décrits parmi lesquels 31 n'ont pas de représentants en culture (Hugenholtz 2009). Cependant, la culture pure reste le seul moyen pour une caractérisation des propriétés physiologiques et l'évaluation du potentiel de virulence, c'est pourquoi il y a eu un regain d'intérêt récent pour les méthodes de culture in vitro de ces espèces jusque-là non cultivables (Vartoukian 2010). Certaines bactéries nécessitent des conditions très particulières incluant la disponibilité de certains nutriments, les conditions de pH, la température ou l'atmosphère d'incubation. Il a été rapporté pour l'analyse de sédiments marins, que les groupes bactériens identifiés étaient différents et spécifiques à chaque méthode de culture utilisée (Kopke 2005).

8. La spectrométrie de masse MALDI-TOF

Le nombre d'espèces identifiées en culture ne dépend que de la multiplicité des approches puisque quasiment chaque approche permet d'identifier des espèces différentes. La part non cultivable d'un écosystème ne dépend donc que du développement d'approches spécifiques pour la culture des espèces jusque là non cultivées. Dans les 10 dernières années, la spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption absorption-time of flight) a été adaptée avec succès pour l'identification systématique des micro-organismes dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette technique permet plus facilement et rapidement le diagnostic d'agents pathogènes humains par une analyse de leur contenu protéique. Le MALDI-TOF permet l'identification des archaea, des eucaryotes et des virus. C'est un outil utilisé dans l'identification de colonies de culture, d'hémoculture, d'urine et d'échantillons environnementaux. L'identification de micro-organismes par MALDI-TOF est une révolution technique, qui est de plus en plus utilisée dans les laboratoires de microbiologie. Depuis plus de 30 ans, il a été démontré que des bactéries ont pu être identifiées en fonction de leurs protéines.

L'utilisation clinique de MALDI-TOF-MS pour les isolats bactériens, ou des échantillons biologiques a été démontrée dans des études récentes avec une grande efficacité (Seng 2009; La Scola 2010). En testant des colonies, il ne suffit que quelques minutes pour obtenir une identification précise. Cette analyse permet l'identification des micro-organismes au niveau des espèces et des sous-espèces permettant la détection de lignées épidémiques. En outre, les résistances aux antibiotiques et les toxines bactériennes peuvent être détectées. Une bonne identification dépend de la qualité de la base de spectres dont on dispose.

9. Les dysfonctionnements du microbiote digestif intestinal

9.1. Obésité

L'obésité est associée à une modification du microbiote. Cette maladie se définit par un excès de graisses dans l'organisme, se traduisant par un indice de masse corporelle (IMC = kg/m^2) supérieur ou égal à 30. De nos jours, l'obésité est un problème majeur de santé publique dans certains pays développés: sa prévalence mondiale ne cesse d'augmenter, devenant épidémique. Actuellement 65% de la population adulte est en surpoids (IMC variant de 25 à 29,9) et 32% sont obèses aux Etats Unis d'Amérique (Hill 1998). Cette augmentation de l'obésité résulte à la fois de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux tels que l'accès à la nourriture, le tissu social, le régime alimentaire ou le manque d'activité physique. De récentes études ont suggéré que les bactéries pouvaient jouer un rôle dans l'obésité via une modification de la composition de la flore intestinale (Rajilic-Stojanovic 2007), l'étude du microbiote digestif d'un individu obèse est alors parue nécessaire. Le rôle du microbiote intestinal dans le stockage des graisses et l'obésité a été récemment étudié. Des résultats obtenus par l'équipe de Jeffrey Gordon (Washington University, USA) suggèrent que le microbiote intestinal permet une meilleure digestion des résidus alimentaires, en contribuant à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides et favorise le stockage des graisses. Il a été montré chez les obèses une augmentation du pourcentage de Firmicutes et une baisse du pourcentage de Bacteroidetes. (<http://www.ifn.asso.fr>).

9.2. Maladie de Crohn

La maladie de Crohn fait partie des pathologies appelées Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Ce terme désigne des affections caractérisées par des lésions inflammatoires chroniques au niveau du tractus digestif (<http://www.afa.asso.fr>). C'est une maladie rare. Son incidence est d'environ 6 cas par an pour 100 000 personnes et sa prévalence d'environ 140 pour 100 000. On estime à 60 000 le nombre de patients touchés en France en 2005, et à 80 000 au Canada en 2006. Elle touche plus souvent les adolescents et les jeunes adultes: la majorité des cas sont diagnostiqués entre 15 et 40 ans. Toutefois, les jeunes enfants et les personnes âgées peuvent également en être atteints. Les causes de la maladie restent encore inconnues même si certains facteurs sont privilégiés : facteurs immunologiques, génétiques, environnementaux. Le microbiote intestinal de patients atteints de la maladie de Crohn montre une modification du rapport Firmicutes/Bacteroidetes avec un déficit marqué du groupe Firmicutes, aussi bien en proportion qu'en nombre d'espèces (Eckburg 2005). La maladie de Crohn peut se révéler par des manifestations cliniques digestives: douleurs

abdominales, diarrhée avec ou sans émission de glaire ou de sang, atteinte de la région anale (fissures, fistules, abcès), masse abdominale (Sartor 2008).

9.3. Diabète de type II

Les bactéries présentes dans le tractus intestinal ont une influence sur la santé de l'hôte, qu'elle soit positive ou négative. L'équilibre écologique de la flore dépend avant tout de la disponibilité de substrats énergétiques à destination des bactéries qui la composent. Le diabète et l'obésité sont des maladies affectant une proportion importante de la population mondiale (4% pour le diabète et 10% pour l'obésité) (Cani 2008). Il n'existe pas à ce jour de moyen thérapeutique efficace pour lutter contre ces affections; de même, les cliniciens sont à la recherche d'outils diagnostiques leur permettant d'évaluer le risque cardiovasculaire associé au développement de ces maladies (Enterome Biosciences, 2012)

Il existe des modulations de la flore dans les maladies métaboliques, sans pour autant que les chercheurs n'aient percé le lien entre ces modifications et la maladie. La flore intestinale contribuerait, par son activité métabolique, à la régulation de la balance énergétique et serait, de ce fait, un modulateur du gain pondéral (Turnbaugh 2007). Mais on ne sait toujours pas comment le statut pondéral influence le microbiote intestinal. Par ailleurs, la translocation vers la circulation générale du lipopolysaccharide issu de la lyse des bactéries Gram négatif intestinales favorise le développement d'une inflammation systémique, participant ainsi à la genèse de l'insulinorésistance et de la stéatose hépatique (vérifié à ce jour chez la souris).

9.4. Diarrhée

Selon l'OMS, la diarrhée se définit par des émissions quotidiennes d'au moins trois selles trop molles, voire liquides depuis moins de 14 jours. On en distingue deux types, selon la fréquence des troubles : aiguë ou chronique. Elle est en général le symptôme d'une infection intestinale pouvant être causée par divers micro-organismes, bactéries, virus ou parasites.

Les maladies diarrhéiques constituent un problème de Santé Publique. Malgré de réels succès dans le domaine de la prévention, des traitements aux antibiotiques, le développement des vaccins et l'amélioration des conditions de vie, elles demeurent la principale cause de mortalité dans le monde selon l'OMS avec 14,7 millions de décès en 2001 soit 26 % de la mortalité mondiale. Dans les pays en développement, ces maladies constituent la deuxième cause de décès chez les enfants de moins de 5 ans et la première cause de mortalité infantile liée à la déshydratation. Chaque année 1 300 000 enfants meurent des conséquences d'une diarrhée, essentiellement dans les pays pauvres (Aubry 2012).

Chapitre I. Généralités

Les diarrhées sévissent en Afrique subsaharienne de façon endémique; elles y représentent 37 % de l'ensemble des cas de diarrhées observés dans le monde, constituent la cause d'un quart de l'ensemble des maladies infantiles qu'on y enregistre, 15 % des consultations ou hospitalisations (OMS 2013). Le Sénégal est classé dans le deuxième groupe des pays africains ayant une prévalence comprise entre 15 et 20 %, mais se range dans la troisième catégorie des pays pour lesquels la morbidité ne représente pas de différence sensible entre le milieu urbain (14,1%) et rural (14,3%) (Ngwe 2007). Les diarrhées peuvent être dues à divers agents pathogènes notamment des parasites, des bactéries ou des virus. Bien que certains d'entre eux soient cosmopolites, la prévalence varie d'une région à l'autre. Cette variation est due à différents facteurs notamment environnementaux, socio-économiques et/ou ceux liés aux habitudes alimentaires de la population. Le pouvoir pathogène de ces parasites est aussi très variable allant du simple portage asymptomatique à des tableaux symptomatiques gravissimes, voire mortels. La détection de ces agents pathogènes chez l'homme est le reflet du niveau d'hygiène alimentaire et fécale et de la salubrité de l'eau de boisson.

9.5. Diarrhées parasitaires

La diarrhée n'est pas un symptôme habituel, ni même fréquent des infestations parasitaires. Dans les zones tropicales, la quasi-totalité des enfants sont porteurs de parasites digestifs, mais ceux-ci ne sont à l'origine que de 5% environ des diarrhées aiguës et de quelques diarrhées chroniques (Gendrel 2003). La plupart des diarrhées parasitaires sont chroniques et durent plus de trois semaines et réapparaissent après un épisode initial aigu. Les parasites agents de diarrhée peuvent être classés en fonction de la localisation de l'infection et de la pathogénie. Les diarrhées parasitaires sont dominées par des protozoaires et des helminthes.

9.5.1. Les Protozoaires

9.5.1.1. *Entamoeba histolytica*

La dysenterie amibienne représente la plus caractéristique des diarrhées invasives due par la forme végétative *Entamoeba histolytica histolytica* (amibe). C'est un protozoaire appartenant à l'embranchement des Sarcomastigophora. La famille des Entamoebidae regroupe deux espèces *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba dispar*. *Entamoeba histolytica* existe sous une forme végétative ou trophozoïte et sous une forme kystique. La forme végétative peut prendre deux aspects différents : une forme non-hématophage (*Entamoeba histolytica minuta*) inoffensive, petite, localisée exclusivement dans la lumière de l'intestin où

Chapître I. Généralités

elle se nourrit de débris cellulaires et une forme hématophage, plus grande que la première, qui pénètre dans la paroi intestinale. *Entamoeba dispar* est une espèce non pathogène très proche morphologiquement de *Entamoeba histolytica*, et beaucoup plus répandue que cette dernière (données de ANOFEL, 2007). *Entamoeba histolytica* infecte le côlon de l'homme et détermine une maladie diarrhéique appelée amibiase ou dysenterie amibienne.



Figure 1 : Kyste d'*Entamoeba histolytica*, Sarfati, 2008



Figure 2 : Formes végétatives ou trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*, Sarfati, 2008

Les trophozoïtes mobiles se multiplient dans la lumière colique. Ils émettent des pseudopodes qui leur permettent de se déplacer et de phagocyter des bactéries, des particules alimentaires et des hématies entraînant des lésions de la paroi intestinale grâce à des facteurs de pathogénicité (facteurs d'adhésion, enzymes protéolytiques) qui sont responsables

d'ulcérations de la paroi colique, d'envahissement pariétal et de dissémination par voie sanguine. Leur multiplication est rapide mais les trophozoïtes sont fragiles et ne sont retrouvés que dans les selles diarrhéiques fraîchement émises. Le trophozoïte d'*Entamoeba histolytica* minuta est souvent confondu avec celui d'*Entamoeba dispar* ; ils sont tous les deux non pathogènes (ANOFEL, 2007). Les kystes sphériques entourés d'une coque rigide sont éliminés dans les selles des malades et des porteurs sains. Le kyste est une forme de dissémination passive et de résistance dans le milieu extérieur. Il survit au minimum 15 jours dans l'eau à 18°C, 10 jours dans les selles, 24h dans un milieu sec. Il résiste bien aux agents chimiques (ANOFEL, 2007).

9.5.1.2. *Giardia lamblia*

Giardia lamblia est un protozoaire flagellé cosmopolite le plus souvent retrouvé dans les selles. Il appartient à la famille des Hexamitidae. Le parasite se présente sous une forme végétative ou trophozoïte qui se multiplie dans le duodénum ou le jéjunum et est responsable de la maladie. La forme kystique est la forme de résistance et de dissémination responsable de la survie dans le milieu extérieur et de la contamination (ANOFEL, 2007). L'incidence est très forte chez les enfants en zone tropicale. Elle toucherait 10 à 15% des enfants de moins de 1 an, et jusqu'à 20% entre 1 à 2 ans, pour atteindre 25 à 30% chez les enfants de moins de 10 ans. En Europe, elle n'est pas rare (Gendrel 2003). Les espèces de *Giardia* ont une activité d'absorption digestive, elles adhèrent aux entérocytes au niveau des micro-villosités de la bordure en brosse par leur plaque ventrale entraînant une atrophie villositaire.

Les trophozoïtes apparaissent aplatis avec une extrémité antérieure large et sont mobiles grâce à 4 paires de flagelles. Leur morphologie en « cerf-volant » les rend facilement identifiables par l'examen direct des selles au microscope optique (ANOFEL, 2007). L'enkystement se fait après la multiplication du parasite. Le kyste qui est une forme de résistance apparaît ovale et contient des noyaux situés dans la partie antérieure et des reliquats flagellaires en forme de S allongé. La paroi est épaisse et lisse.



Figure 3 : Formes végétatives de *Giardia lamblia*, Sarfati, 2008

9.5.1.3. *Cryptosporidium*

La cryptosporidiose est une maladie parasitaire due à des protozoaires coccidies, *Cryptosporidium hominis* retrouvé uniquement chez l'homme et *Cryptosporidium parvum*, qui atteint les bovins, les ovins, les caprins et les porcins nouveau-nés et l'homme. La coccidie émet des oocystes fécaux infestants (Derouin 2009). En raison de la grande résistance des oocystes et de la possibilité de contamination des réserves naturelles d'eau, on a observé des épidémies de cryptosporidioses pouvant toucher plusieurs milliers de personnes (400 000 cas à Milwaukee aux USA en 1993) (ANOFEL 2011). *Cryptosporidium parvum* est un protozoaire parasite intestinal très répandu chez l'animal et chez l'homme, provoquant des diarrhées redoutables chez les individus jeunes ou immunodéprimés. Il se transmet en effet très facilement par l'eau et résiste à de nombreux traitements. La cryptosporidiose chez l'homme a progressé ces dix dernières années et les cas de contamination par voie hydrique sont de plus en plus nombreux. En effet, il existe deux génotypes différents de *C. parvum*: l'un commun aux ruminants et à l'homme, responsable de la cryptosporidiose zoonose et l'autre évoluant uniquement chez l'homme et responsable d'une contamination inter-humaine Cette parasitose est cosmopolite sous forme sporadique ou épidémique. Les taux d'infection se situent entre 0,6 et 2% dans les pays industrialisés et entre 4 et 32 % dans les pays en développement. Chez les patients atteints du sida et présentant une diarrhée chronique les taux d'infections sont de 3 à 20% aux USA et de 50 à 60% en Afrique et en Haïti. Les épidémies se manifestent le plus souvent par contamination fécale des réseaux de distribution de l'eau

potable (oocystes non détruits par les désinfectants habituellement utilisés pour le traitement de l'eau destinée à la consommation humaine).



Figure 4 : Oocyste sporulé de *Cryptosporidium* (cours de Parasitologie 2008-2009)

9.5.1.4. *Microsporidium*

Les microsporidioses sont dues à des protistes primitifs dépourvus de mitochondries et à développement intracellulaire obligatoire (Sarfati 2001). Ces parasites appartiennent au phylum des Microspora qui comporte actuellement plus de 1300 espèces réparties entre 144 genres et sont des parasites opportunistes touchant surtout les sujets immunodéprimés et particulièrement ceux infectés par le VIH. D'autres causes d'immunodéficience sont également des facteurs de risque. Les espèces les plus fréquentes chez l'homme sont *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* qui sont essentiellement responsables d'une diarrhée chronique (Siala 2007).

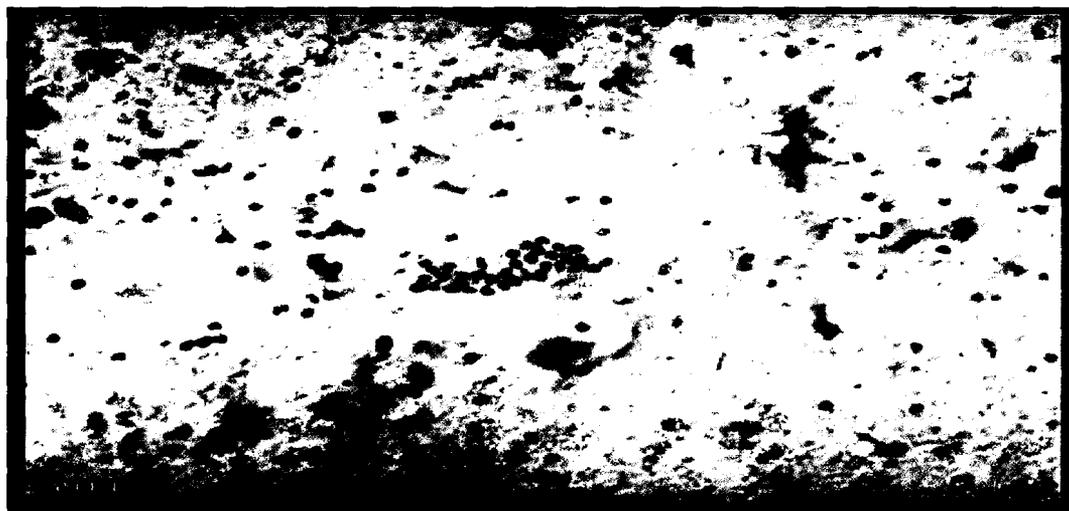


Figure 5 : Oocystes d'*Encephalitozoon intestinalis* : coloration de Trichome Weber et de chromotrope 2 R (source ANOFEL)

La microsporidiose intestinale s'observe habituellement à un stade avancé d'immunodépression avec des taux de lymphocytes T CD4 $<50/mm^3$. D'autres causes d'immunodéficience (greffés, malnutrition) sont aussi des facteurs de risque accru (Sarfati 2001). La microsporidiose est une parasitose cosmopolite. Les données de sa prévalence sont très variées. Elles dépendent de la région géographique, de la population étudiée et peut-être plus encore des méthodes diagnostiques utilisées. Elle peut varier de 1,5 à 50 % (Didier 2006; Anane 2010).

9.5.2. Les Helminthes

9.5.2.1. *Ascaris lumbricoïdes*

Les ascaridioses sont fréquentes chez le jeune enfant en Afrique tropicale. La transmission est oro-fécale. *Ascaris lumbricoïdes* est un ver rond de grande taille qui vit au niveau de l'intestin. Il appartient à la famille des Ascarididae et au genre *Ascaris*.



Figure 6 : Œuf d'*Ascaris lumbricoïdes* Source : Parasitologie Mycologie. CHU Nancy (François et al, 2004).

Les ascaris adultes vivent 6 à 18 mois dans le jéjunum où ils ingèrent les particules alimentaires. Les femelles peuvent pondre jusqu'à 200 000 œufs par jour. Ces œufs sont en très grand nombre dans l'intestin et évacués avec les selles. Ils sont entourés d'une double coque brune, d'aspect mamelonné très caractéristique qui les rend très résistants dans le milieu extérieur. Après ingestion d'un œuf embryonné (crudités, fruits, eau souillée), la larve est libérée dans le tube digestif. Elle traverse la paroi intestinale et gagne le foie où elle séjourne trois à quatre jours, y subissant une mue, puis gagne le poumon par voie sanguine. La larve traverse alors la paroi de l'alvéole pulmonaire (10^e jour), remonte l'arbre bronchique jusqu'au pharynx où elle est habituellement déglutie, puis gagne le jéjunum où elle devient adulte.

9.5.2.2. *Trichuris trichiura*

Trichuris trichiura ou trichocéphale est un nématode intestinal responsable de la trichocéphalose chez l'homme. Chez les enfants, l'infection intense se manifeste par une diarrhée dysentérique. Les vers adultes sont faiblement hématophages. Les œufs éliminés dans les selles ont une forme ovale caractéristique « en citron ». Ils ne sont pas embryonnés à la ponte. L'œuf éliminé dans les selles ne devient infestant qu'après quelques semaines de séjour dans le sol et le reste durant plusieurs années. Dans les pays chauds, il faut environ un mois pour que l'œuf soit infestant. L'ingestion d'un œuf embryonné (à partir de crudités ou d'eaux de boisson souillées) est suivie de la libération dans le tube digestif d'une larve qui se fixe après cinq mues dans la muqueuse cœcale, devenant adulte en un mois.



Figure 7: Œuf de *Trichuris trichiura* (trichocéphale) Parasitologie Mycologie. CHU Nancy (François et al, 2004).

9.5.2.3. *Enterobius vermicularis*

Enterobius vermicularis (oxyures) dans le tube digestif humain détermine l'oxyurose qui est une parasitose très répandue dans les pays tempérés. Elle touche essentiellement les enfants d'âge scolaire, les personnes placées dans des structures hospitalières de type psychiatrique, et les personnes âgées. Elle est favorisée par la promiscuité et la vie de communauté.

Les adultes vivent dans la région iléo-cœcale. L'oxyure a un cycle parasitaire intégralement digestif. Ce cycle commence par une ingestion d'aliments contaminés, les mains souillées, ou par des œufs d'oxyures directement infestant. Les œufs ingérés éclosent dans l'estomac de l'homme, les larves migrent vers les intestins (région iléo-cœcale pour donner les adultes qui vont s'accoupler. La ponte a lieu préférentiellement la nuit et au moment du coucher, ce qui explique notamment la symptomatologie chez les enfants. Les œufs sont auto-embryonnés à la ponte, ce qui signifie qu'ils sont directement contaminants dès leur émission.

Une auto-réinfestation est donc possible, notamment chez les enfants par contamination oro-fécale.



Figure 8: Œufs embryonnés d'*Enterobius vermicularis* (oxyure). Source : Parasitologie. Faculté Médecine Necker, Paris. Pays J.F. (François *et al* 2004).

9.5.3. Les Trématodes

9.5.3.1. *Schistosoma mansoni*

La schistosomiase est une parasitose chronique provoquée par des vers (trématodes) du genre *Schistosoma mansoni* ou *intercalatum*. Chaque année, 200 millions de personnes au monde sont atteintes. La transmission de la schistosomiase est avérée dans 77 pays et pour 52 d'entre eux le risque d'infection est maximal (OMS 2009). La schistosomiase est considérée comme

Chapitre I. Généralités

la deuxième infection parasitaire en importance après le paludisme. L'incidence est très grande dans les régions tropicales et subtropicales, notamment dans les communautés démunies qui n'ont pas accès à une eau potable et à un assainissement satisfaisant (Mayaka Ma-Nitu 2001). Les parasites se développent successivement chez deux hôtes. L'hôte intermédiaire est un mollusque d'eau douce, et l'hôte définitif est en général l'homme ou le bovin. Les œufs éclos s'introduisent dans un petit escargot aquatique, pour y passer la première partie de leur vie. Les œufs deviennent des petits vers, nommés cercaires, qui nagent et contaminent l'hôte humain, qui est en contact avec l'eau, en traversant la peau, pénétrant dans les veines, puis dans le tube digestif où les œufs sont pondus et éliminés ensuite par les selles dans le milieu aquatique. Ce sont les œufs qui provoquent la symptomologie en créant des granulomes dans la muqueuse et la sous-muqueuse de l'intestin.



Figure 9 : Œufs de *Shistosoma mansoni* Source : Parasitologie. Faculté Médecine Necker, Paris. Pays J.F. (François *et al* 2004).

9.6. Diarrhées virales

Les gastroentérites virales sont des infections fréquentes qui peuvent toucher aussi bien les enfants que les adultes et qui surviennent de façon soit sporadique soit le plus souvent épidémique. Dans les pays développés, elles revêtent dans la majorité des cas un caractère bénin, ne mettant en jeu le pronostic vital que chez les sujets particulièrement fragiles (prématurés, immunodéprimés, personnes âgées). En revanche, dans les pays en voie de développement, elles sont une cause importante de morbidité et de mortalité et constituent un véritable problème de santé publique. Les principaux agents des diarrhées virales sont les Rotavirus et les Adenovirus chez les nourrissons et les jeunes enfants dans le monde.

Chapître I. Généralités

Ces virus provoquent des infections de gravité variable allant du simple portage asymptomatique à la diarrhée gravissime avec déshydratation majeure (Gault 1999; O'Halloran 2000). Les Rotavirus et Adenovirus humains ont comme réservoir l'enfant âgé 1 à 5 ans. Les virus vivent dans les voies respiratoires et/ou le tube digestif. Éliminés dans les selles pendant 1 à 2 mois, ils survivent 2 à 3 mois dans l'environnement, particulièrement hydrique. Les mammifères (bovins, primates, félins) et les oiseaux possèdent aussi leurs Rotavirus. L'examen direct des virus se fait par observation en microscopie électronique. C'est une technique longue, coûteuse et difficile à mettre en œuvre. Elle était surtout utilisée avant le développement des techniques d'amplification génique telles que la PCR en temps réel, mais elle permet aussi la visualisation des virus non cultivables. Elle peut être prise comme méthode de référence pour le diagnostic des virus (Regagnon 2005). Actuellement quatre grands groupes de virus sont considérés comme responsables de la majorité des diarrhées virales : les Rotavirus, les Adenovirus entériques, les Astrovirus et les Calicivirus dont l'agent de Norwalk.

9.6.1. Rotavirus

Rotavirus : ils font partie de la famille des Reoviridae et du genre Rotavirus. Leur taille varie de 70 à 80 nm (Fleury 1999). On distingue 7 groupes de A à G, sans communauté antigénique (protéine VP6) (Parashar 2003). Plus de 50 % des diarrhées virales sont dues au Rotavirus du groupe A. Chez le jeune enfant (6 mois à 2 ans), les Rotavirus sont la première cause de diarrhée. Ils provoquent souvent des épidémies hivernales extensives et sont responsables d'infections communautaires et nosocomiales (dans les services de pédiatrie). La mortalité est estimée à 1 million de morts chez des enfants de moins de cinq ans dans les pays en voie de développement.

Rota virus: 55 nm



Figure 10 : Structure d'un Rotavirus (Microscopie Electronique URMITE Marseille)

9.6.2. Adenovirus

Ce sont des virus à ADN, nus, très résistants dans le milieu extérieur. Ils appartiennent à la famille des Adenoviridae et au genre Aviadenovirus (Fodha 2007).

La technologie immunochromatographique est utilisée pour la détection des Rotavirus et Adenovirus. Les réactions immunologiques sont visualisées sur une bandelette diagnostique (Derougemont 2009). Les Adenovirus entériques sont responsables de gastro-entérites sans caractère saisonnier. Ces virus se multiplient dans les entérocytes de l'intestin grêle. Leur transmission se fait surtout par voie digestive (féco-orale) et la contamination peut être soit directe, interhumaine, soit indirecte par l'intermédiaire d'eau ou d'aliments contaminés.

Adénovirus: 75 nm

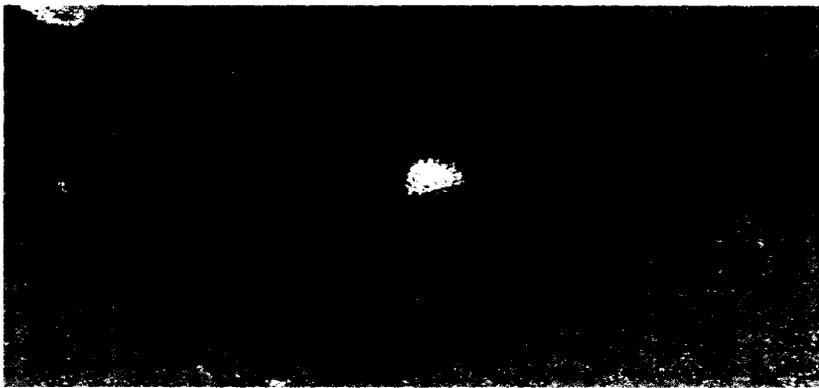


Figure 11 : Structure d'un Adenovirus (Microscopie Electronique URMITE Marseille)

9.6.3. Calicivirus

Ils appartiennent à la famille des Caliciviridae et sont retrouvés chez divers hôtes: homme, primates, chat, porc, poulet, reptiles, dauphins et amphibiens (Van der Poel 2000).

Le virus de Norwalk est le virus type du genre Norovirus de la famille Caliciviridae. Les Norovirus sont responsables de la majorité des diarrhées non bactériennes provoquant souvent des épidémies d'origine alimentaire ou hydrique. Étant très infectieux (10 à 100 virus suffisent à provoquer une infection), ils provoquent régulièrement de multiples cas de maladie partout où des personnes cohabitent dans un espace restreint, notamment dans les familles, les foyers, les hôpitaux et les jardins d'enfants.

Calicivirus: 25 à 30 nm

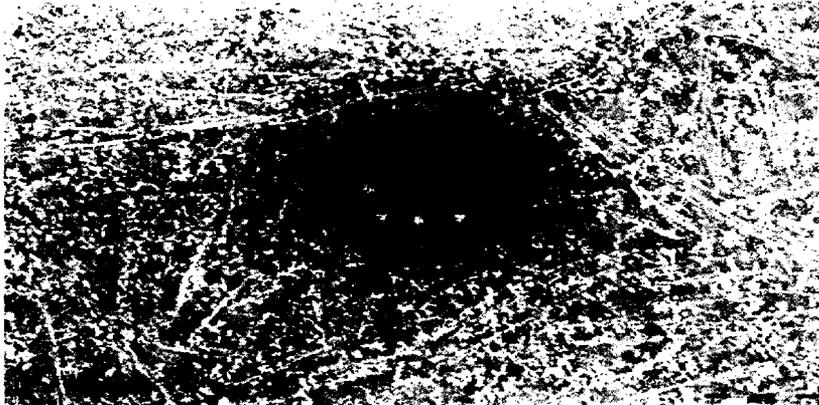


Figure 12 : Structure de Calicivirus (Microscopie Electronique URMITE Marseille)

9.6.4. Enterovirus

Ils sont rarement responsables de diarrhées virales. Ils sont recherchés en dernier recours.

Entérovirus: 20 à 30 nm



Figure 13 : Structure d'un Enterovirus (Microscopie Electronique URMITE Marseille)

9.6.5. Astrovirus

Ils comprennent huit sérotypes. Ils sont également responsables de gastro-entérites chez l'enfant, les personnes âgées et les immunodéprimés et représentent 2 à 8% des diarrhées virales.

Chapître I. Généralités

La diversité antigénique de *Shigella* s'exprime par l'émergence de souches atypiques. En l'absence d'agglutination avec les sérums dirigés contre les sérotypes connus il est important d'utiliser des méthodes de sérotypages moléculaires (Sansonetti 2006). Le genre *Shigella* renferme quatre groupes appelés espèces, ces dernières renferment des sérogroupes.

Sous groupe A : *Shigella dysenteriae* (15 sérotypes)

Sous groupe B : *Shigella flexneri* (14 sérotypes)

Sous groupe C : *Shigella boydii* (20 sérotypes)

Sous groupe D : *Shigella sonnei* (1 seul sérotype)

Shigella dysenteriae type 1 (Sd1) ou bacille de Shiga, est cause de la forme épidémique tandis que *Shigella flexneri* 2 a est responsable de la forme endémique.

Les shigelles sont des bactéries strictement humaines elles ne sont pas retrouvées dans la nature en dehors de l'environnement humain. Elles sont douées de pouvoir invasif et destructif pour la muqueuse colique. La dose minimale infectante est de 10 à 100 bactéries (Avril 1999).

Les manifestations cliniques des shigelloses sont liées à un phénomène invasif avec envahissement des cellules intestinales, multiplication intracellulaire et destruction des cellules. Il s'ensuit une importante inflammation de la muqueuse accompagnée d'une diarrhée glairo-sanglante. A ce mécanisme invasif s'ajoute pour Sd1 la sécrétion d'une toxine (ou toxine-shiga ou toxine dysentérique), cytotoxique, détruisant les entérocytes au niveau jéjunal et neurotoxique. L'invasion bactérienne dépend des facteurs chromosomiques et plasmidiques. Chez *Shigella flexneri*, quatre gènes situés sur le plasmide pINV ont été caractérisés: *icsA*, *ipaB*, *ipaC*, *ipaD*. L'activité des protéines produites par ces gènes permet l'invasion des cellules qui seront détruites. La protéine p120 codée par le gène *icsA* est nécessaire à la diffusion intracellulaire des bactéries, les protéines IpaB et IpaC sont impliquées dans l'induction de la phagocytose du corps bactérien par la cellule, la protéine IpaD intervient dans l'adhésion de la bactérie qui serait responsable de la composante hydrique de la diarrhée. Il existe des formes intermédiaires entre le syndrome dysentérique aigu et des formes assez banales.

Les formes bénignes sont des diarrhées aqueuses, souvent non fébriles. Elles sont dues, en particulier, à *Shigella sonnei*, espèce prévalente dans les pays industrialisés. La forme classique ou le syndrome dysentérique est une diarrhée hydrique qui dure 2 à 3 jours. Le syndrome dysentérique s'installe après une incubation courte de 24 à 72 heures, caractérisé par une dysenterie fébrile glairo-sanglante. Les formes graves sont surtout observées en zone tropicale et sont dues à *Shigella dysenteriae* sérotype 1 et *Shigella flexneri*

2a (Gassama-Sow 2010). Des formes subaiguës sont observées et durent plusieurs semaines ainsi que des rechutes.

9.7.2. Les salmonelloses

Les salmonelloses comprennent la fièvre typhoïde et les salmonelloses non typhiques (ou non typhoïdiques). Les salmonelles sont des entérobactéries, parasites intestinaux des animaux vertébrés qui se disséminent dans la nature par les excréta. Chez les animaux à sang chaud, elles sont souvent pathogènes. Dans les PED, l'incidence est élevée, liée aux mauvaises conditions d'hygiène et aux risques de transmission fécale. Elles affectent le plus souvent les enfants de 1 à 5 ans (âge préscolaire). L'incidence est de 21 millions de cas, 1 à 4% ont une issue fatale (90% des décès en Asie en 2004). Dans les PED, elle est de 540 cas/100 000 (versus 0,2 cas/100 000 dans les pays tempérés). Dans les pays industrialisés, la plupart des fièvres typhoïdes sont contractées lors d'un voyage à l'étranger. Cent à deux cent souches de *S. Typhi* sont isolées en France chaque année, provenant presque exclusivement de cas importés. L'Afrique est considérée comme une zone d'incidence moyenne; en Afrique de l'Ouest, on estime à 91.737 le nombre de cas de fièvre typhoïde soit une incidence de 38 par 100.000 personnes et par an (Crump 2003). L'homme est le seul réservoir de virus. La contamination se fait par les eaux et les aliments à partir des selles (malades ou porteurs asymptomatiques). Dans les régions les plus touchées, le pic d'incidence survient parmi les enfants et les adolescents âgés de 4 à 19 ans. Par ailleurs, l'incidence des souches de *S. Typhi* multirésistantes aux antibiotiques augmente rapidement depuis 1990, en particulier dans le sous-continent indien et en Asie du sud-est.

Le genre *Salmonella* fait partie de la famille des entérobactéries, bacilles à Gram négatif et est divisé en deux espèces: *Salmonella enterica*, espèce majoritaire et *Salmonella bongori*, espèce rare (Tindall 2005). L'espèce *enterica* est elle même subdivisée en six sous-espèces dont *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica*. Ces taxons sont ensuite subdivisés sur la base du sérotypage (détermination de l'antigène somatique O et ou des antigènes flagellaires H) et plus de 2501 sérotypes de *Salmonella* (Weill 2010) ont été identifiés. Le réservoir des bactéries du genre *Salmonella* est principalement le tube digestif des vertébrés. Certaines salmonelles sont strictement adaptées à l'homme (salmonelles des sérotypes Typhi, Paratyphi C et certaines populations de Paratyphi B), alors que les autres peuvent être retrouvées chez tous les vertébrés. La contamination humaine par les salmonelles non-typhiques s'effectue essentiellement par la consommation d'aliments contaminés (œufs et

Chapitre I. Généralités

préparations à base d'œufs, volailles, charcuteries, fromages au lait cru,...), consommés crus ou insuffisamment cuits.

L'espèce principale est *S. enterica* qui comprend elle-même six sous-espèces dont la plus fréquente est *Salmonella enterica enterica*, elle-même divisée en plusieurs sérovars: Enteritidis, Dublin, Infantis, Typhi, Paratyphi, Typhimurium, Virchow, etc.

Les salmonelloses non typhiques sont responsables d'infections sporadiques ou épidémiques, le plus souvent en raison de la contamination des aliments ou de portage asymptomatique. Les germes sont invasifs, se multiplient dans la lamina propria et entraînent une diarrhée par production d'une entérotoxine, comme dans le choléra. Ils ne donnent pas habituellement de bactériémie prolongée, car ils sont rapidement tués par les phagocytes sauf pour *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* qui donnent des infections systémiques chez les sujets à risques (nouveaux nés, enfants drépanocytaires, immunodéprimés).

Dans les fièvres typhoïdiques, les bacilles typhiques adhèrent sur les entérocytes et les follicules lymphoïdes (cellules M des plaques de Peyer) se multiplient et rejoignent les ganglions mésentériques. Leur lyse libère l'endotoxine qui va imprégner les terminaisons nerveuses du système neurovégétatif abdominal, créent des lésions intestinales.

Le traitement de la fièvre typhoïde repose sur les antibiotiques à forte pénétration intracellulaire. Le chloramphénicol, l'ampicilline, le cotrimoxazole sont les antibiotiques de première intention. Le développement de la résistance a entraîné la généralisation de l'usage des fluoroquinolones, y compris en pédiatrie. Actuellement, on note des résistances aux fluoroquinolones, soit une sensibilité réduite (Vietnam), soit une résistance totale (Pakistan, Inde).

9.7.3. Les entérites à *Escherichia coli*

Les entérites à *Escherichia coli* sont dues à différents pathotypes de *E. coli* pathogène. Les souches pathogènes diffèrent des non pathogènes par la présence de facteurs de virulence. *Escherichia coli* est une bactérie commensale de la flore normale. Néanmoins certaines souches sont responsables de diarrhées sécrétoires et /ou invasives (Hans 2002; Stuart 2006). Les souches de *Escherichia coli*, agents de diarrhées sont actuellement classées en 6 pathovars selon l'expression clinique de la diarrhée et les facteurs de virulence (Nataro 1998): *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), *Escherichia coli* entéro-toxinogène (ETEC), *Escherichia coli* entéroinvasif (EIEC), *Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC) et

Escherichia coli entéroaggrégant (EAGGEC). Ces pathovars ont été aussi décrits dans une étude réalisée au Sénégal chez des sujets porteurs du virus VIH (Gassama-Sow 2004).

***Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC)**

Ils sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement de la zone intertropicale et sont aussi l'agent responsable de la diarrhée du voyageur. Au Sénégal, une étude réalisée en 1988 chez 405 enfants âgés de 0 à 5 ans a montré que les ETEC occupaient la deuxième place après les *Escherichia coli* entérotoxigènes avec un taux de prévalence de 13,1% (Aïdara 1988). Les ETEC provoquent une diarrhée aqueuse en perturbant les systèmes de contrôle de la sécrétion entérocytaire et parfois un syndrome cholériforme avec risque de déshydratation. Les ETEC adhèrent aux cellules épithéliales de l'intestin grêle par des structures d'adhésion ou facteurs de colonisation sous forme d'adhésines, de fimbriae ou de fibrilles. Les exotoxines des ETEC sont des protéines de type thermolabile (LT) et de type thermostable (ST).

***Escherichia coli* entérotoxigènes (EPEC)**

Ils sont responsables de diarrhées infantiles persistantes souvent épidémiques, particulièrement chez les enfants de 0 à 5 ans dans les PED. Ce pathovar est rarement responsable de diarrhée chez l'adulte. La pathogénicité est associée au gène *eae* ("E. coli attaching and effacing"). Les souches EPEC adhèrent intimement aux entérocytes de l'intestin grêle, ils effacent les microvillosités et provoquent une infiltration cellulaire de la lamina propria. Au Sénégal, une étude réalisée en 1988 chez des enfants a montré une prédominance des EPEC avec un taux de prévalence de 15,5% (Aïdara 1988).

***Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)**

Les infections à EHEC sont associées lors des épidémies à des colites hémorragiques qui peuvent évoluer à un syndrome hémolytique urémique (SHU), une insuffisance rénale ou un purpura thrombopénique pouvant aboutir à la mort. Les EHEC ont été à l'origine de plusieurs épidémies de diarrhées hémorragiques et aqueuses de grande ampleur avec une létalité importante aux USA en 1983; ils posent aujourd'hui un problème de sécurité alimentaire dans les pays industrialisés. Actuellement, trois sérotypes d'EHEC sont identifiés O:157; O:26; O:111. Leur pouvoir pathogène est caractérisé par une forte adhérence à la surface de l'iléon distal du cæcum et du colon droit et à la production d'une ou plusieurs vérotoxines VT ou SLT (Shiga-like toxin).

***Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC)**

Ils sont responsables de syndromes dysentériques proches de la shigellose aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant. L'incidence des infections à EIEC est assez faible: elle est de 0,7%

chez des enfants sénégalais (Aïdara 1988) et 5,7% chez des sujets VIH (Gassama-Sow 2004). Le sérotype O124 reste le plus fréquent et a été la cause d'une épidémie de dysentérie aux USA en 1973. Le pouvoir pathogène des EIEC est caractérisé par leur capacité à envahir et à se développer dans les cellules épithéliales du colon. Le phénomène d'invasion est sous la dépendance de facteurs chromosomiques et plasmidiques du gène *ipaH* (invasion plasmid antigen H).

***Escherichia coli* entéroaggrégants (EAggEC)**

Les EaggEC sont responsables de diarrhées aqueuses persistantes aussi bien chez de jeunes enfants dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Les EAggEC sont suspectés d'être responsables souvent de la diarrhée du voyageur au même titre qu'ETEC, qui lui est souvent associé (Adachi 2002). La forte prévalence d'EAggEC chez les patients infectés par le VIH le classe parmi les pathogènes opportunistes (Gassama-Sow 2004). Sa pathogénicité est liée à une adhésion agrégative et à l'hémagglutination aux érythrocytes. Récemment en 2011, une épidémie de diarrhée eue en Allemagne ayant provoqué une vingtaine de cas de décès était due à *Escherichia coli* enteroaggrégatif.

***Escherichia coli* entéroadhérents ou à adhésion diffuse (DAEC)**

Les DAEC constituent le groupe le plus hétérogène des *E. coli* provoquant des diarrhées. Plusieurs études ont incriminé DAEC dans les diarrhées infantiles aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Cependant des études réalisées chez des enfants de moins d'un an (Scaletsky 2002), et chez des sujets adultes VIH (Gassama-Sow 2004) ont montré un taux de prévalence de DAEC identique chez les cas et chez les témoins, ce qui laisse présager d'une absence de pathogénicité de ce pathovar.

La virulence des DAEC se caractérise par leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales. Deux familles de gènes codant pour cette adhésion ont été identifiées: F1825 et AIDA-I. Deux nouveaux pathotypes sont actuellement proposés sur la base de l'identification des cytokines; il s'agit de:

E. coli producteurs de cytokines létales par distention cellulaire (CLDT), également retrouvés chez *Shigella* spp et *Campylobacter* spp (Scott 1994).

E. coli entéroadhérents qui ont la propriété d'adhérer aux cellules HEP-2 ou HeLa et aux cellules épithéliales intestinales en culture.

E. coli est naturellement sensible aux antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif. Cependant des résistances multiples sont notées depuis très longtemps concernant des classes d'antibiotiques diverses: pénicillines, aminosides, chloramphénicol.

9.7.4. Le choléra

Parmi les maladies diarrhéiques, le choléra est la troisième cause de mortalité mondiale (120 000 cas/an) après la salmonellose typhoïdique (600 000 cas/an) et la shigellose (1 100 000 cas/an). Depuis les années 1960, représentant le début de la septième pandémie, le continent africain commençait à connaître des vagues d'épidémies de choléra.

L'Afrique est le continent le plus touché avec plus de 90 % du nombre total mondial déclaré à l'OMS. En 2007, environ 106 000 cas et 2 000 décès de choléra ont été notifiés pour 30 pays africains. Entre 2005 et 2007, les taux d'attaque ont atteint environ 28 % en Afrique de l'ouest (2005) et Afrique de l'est (2007) et 73 % en Afrique centrale (2006). En 2006, les létalités se sont élevées entre 3,55 et 3,6 % respectivement en Afrique de l'ouest et centrale. En 2004-2005, une épidémie de choléra est survenue au Sénégal à partir de la ville de Touba et s'est propagée à toutes les villes du pays causant plus de 23325 cas avec plus de 303 morts enregistrés et un taux de létalité avoisinant les 2%. Cette épidémie était la troisième en moins de 10 ans au Sénégal. En juillet 2008, il y'a eu apparition d'une épidémie de choléra au Sénégal où ont été enregistrés 525 cas suspects, 41 cas confirmés et 8 décès (Manga 2008). En 2010, le continent africain a de nouveau été frappé par une vague dévastatrice de choléra, qui a touché les régions de l'Afrique centrale, à savoir le Cameroun, le Tchad, le Niger, le Nigeria et autour du bassin du lac Tchad. Les sérogroupes de *Vibrio* O1 et O139 présentant des biotypes classiques ou El Tor continuent à causer des épidémies particulièrement dans les PED. Récemment en Asie, des souches hybrides (qui possèdent à la fois la toxine *Ctx* du classique et du El Tor) sont responsables d'épidémies (Ashrafus 2008). Le choléra ne touchait principalement que les pays asiatiques. Au Sénégal, à l'instar des autres pays africains le sérotype O1 est le seul rapporté dans la littérature. Jusqu'à nos jours, le choléra causé par le sérotype *Vibrio cholerae* O139 n'a jamais été rapporté en Afrique (Rituparna 2013).

Les vibrions sont des bacilles à Gram négatif généralement isolés, droits ou incurvés assez courts et parfois ayant la forme coccobacillaire. La transmission se fait soit par contact manuel direct avec un porteur et surtout avec un malade ou un cadavre. L'homme est le principal réservoir de vibrions cholériques. Le vibron est généralement retrouvé durant 6 à 10 jours chez le porteur et parfois plus longtemps (porteur chronique). La toxicité de *V. cholerae* est due principalement à un îlot de gènes de virulence réunis en une cassette de virulence appelée *Ctx*. Les vibrions traversent la couche de mucus, se multiplient et adhèrent aux entérocytes de l'intestin par leurs antigènes d'attachement. Ils libèrent une entérotoxine provoquant le tableau du choléra qui se manifeste par une diarrhée aqueuse sécrétoire avec perte d'électrolytes. Les selles sont abondantes, afécales, incolores avec des grumeaux

blanchâtres (grain de riz). Cette fuite électrolytique est liée à la sécrétion d'entérotoxine (CT: Cholera Toxin de 84Kda). Dans le traitement des diarrhées aiguës, la réhydratation est recommandée en première ligne suivi d'un traitement antibiotique. *Vibrio cholerae* est généralement sensible à la tétracycline, aux aminosides et au chloramphénicol (Quilici 2010). Cependant des résistances à de multiples antibiotiques chez *V. cholerae* ont été décrites; elles concernent le chloramphénicol, le cotrimoxazole, la kanamycine. Les souches résistantes sont surtout isolées pendant les épidémies et les facteurs de la résistance aux antibiotiques semblent être liés à un transfert par les plasmides ou par les transposons.

9.7.5. Les campylobactérioses

Les Campylobacter ont pendant longtemps été des bactéries connues dans le domaine vétérinaire principalement chez les moutons, les porcs et la volaille. C'est durant ces 40 dernières années que ces microorganismes ont été connus comme étant agents responsables de diarrhée surtout chez les enfants (Oberhelman 2000). Les cas de campylobactérioses sont le plus souvent sporadiques. Chez l'homme, *C. jejuni* et *C. coli* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées. La contamination de l'homme se fait par voie digestive généralement par l'intermédiaire d'aliments emballés « sous vide », ce qui favorise la microaérophilie, propice au développement de ces bactéries. *Campylobacter* est une espèce qui se développe en atmosphère microaérophile (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) à une température de 37°C jusqu'à 42°C (Ferron 1989). Le genre *Campylobacter* comprend des bactéries incurvées, spiralées ou en forme de S et de dimensions 0,5/5 µm. Ce sont des Gram négatifs, mobiles par un flagelle polaire unique et non engainé (Freney 2000). Ils peuvent donner des formes coccoïdes en culture. Dix huit espèces et 6 sous-espèces ont été décrites dont les plus fréquemment rapportées en pathologie humaine sont *C. jejuni* et *C. coli* qui appartiennent au groupe des Campylobacter thermophiles (Euzéby 2007). Les Campylobacter sont des bactéries entéroinvasives. Habituellement, la maladie se développe en 2 à 3 jours après l'ingestion des aliments souillés, mais les symptômes de l'infection disparaissent spontanément au bout d'une semaine. Les coprocultures peuvent toutefois rester positives pendant 2 à 5 semaines et dans 5 à 10% des cas, des rechutes peuvent survenir (Berche 1991). Malgré l'importante littérature consacrée à la physiopathologie des diarrhées à *Campylobacter jejuni*, celle-ci reste obscure. *Campylobacter jejuni* peut provoquer une diarrhée de type motrice. Certaines souches de *Campylobacter jejuni* produiraient une entérotoxine thermolabile, fonctionnellement et immunologiquement apparentée à la toxine cholérique ou des ETEC, mais son rôle pathogène apparaît comme mineur. Un mécanisme invasif peut

également être évoqué dans les infections à *Campylobacter jejuni* comme cela est observé avec les shigelles (Berche 1991). *C. fetus* est souvent responsable de septicémies dans les cas de diarrhées survenant chez la femme enceinte ou les sujets immunodéprimés. Dans de nombreux pays, *Campylobacter* est isolé 3 à 4 fois plus souvent à partir de patients atteints d'infections des voies alimentaires que les autres entéropathogènes bactériens (tels que *Salmonella* ou *Escherichia coli*). Dans les pays à revenu élevé, les cas de campylobactériose dépassent souvent ceux de la salmonellose. Bien que des données soient limitées dans les pays à faible revenu et à revenu intermédiaire, la charge de morbidité due à l'infection à *Campylobacter* est considérable (WHO 2013). Dans les pays industrialisés, *Campylobacter jejuni* est isolé chez 5 à 16% des enfants qui ont la diarrhée (Allos 2001). Dans les pays en voie de développement, l'épidémiologie est différente, et surtout mal connue. Une étude réalisée au Kenya chez des enfants a montré que 30% des diarrhées bactériennes étaient dues à *Campylobacter* (Shapiro 2001). Au Sénégal, il y a très peu de données sur l'épidémiologie des *Campylobacter*. Une étude réalisée chez des enfants de moins de 5 ans a montré une incidence de 9% (Aïdara 1989). Les principales données disponibles concernent la filière avicole (Cardinale 2003). L'accès limité aux coprocultures et les performances insuffisantes de ces dernières pour isoler des *Campylobacter*, expliquent en grande partie la sous-estimation de sa responsabilité dans les diarrhées. Les antibiotiques utilisés sont les macrolides, la doxycycline et les fluoroquinolones. Les macrolides restent les antibiotiques de choix et la résistance à l'érythromycine reste très faible (Nachamkim 2000). Les fluoroquinolones, très efficaces contre les bactéries entériques, sont utilisées pour traiter les diarrhées bactériennes. L'émergence de la résistance à ces molécules rend leur efficacité moins certaine (Engberg 2001). La résistance de *C. jejuni* et *C. coli* aux fluoroquinolones et aux macrolides s'explique par la forte pression de sélection liée à l'introduction des antibiotiques en médecine vétérinaire.

9.7.6. Les yersinioses

Yersinia enterocolitica, est à l'origine d'un syndrome diarrhéique accompagné de fièvre et de douleurs abdominales le plus souvent de la fosse iliaque droite donnant un syndrome pseudo appendiculaire. En dehors des épidémies, les cas de yersinioses sont le plus souvent sporadiques. Les entérites à *Yersinia enterocolitica* ont une incidence faible en Afrique: 4% au Burkina-Faso et au Nigéria (Bonfiglio 2002); au Sénégal, le taux d'infection chez les

enfants de moins de 5 ans est négligeable (0,36%) (Aïdara 1989). *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* sont des espèces psychrophiles et peuvent se multiplier à de basses températures (+4°C et +10°C). Les souches pathogènes de *Y. enterocolitica* secrètent une enterotoxine qui présente une forte homologie avec la toxine ST de *Escherichia coli*. Les capacités invasives de *Y. enterocolitica* ont été rattachées à la présence d'un plasmide de 70 à 75 kilobases (Kb). Il contribue à la prolifération bactérienne dans les tissus. L'espèce *Y. enterocolitica* est naturellement résistante à l'ampicilline et aux céphalosporines de première génération par production à la fois d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase inductible. Les déterminants de cette résistance sont spécifiques de ce groupe: il s'agit de bêtalactamases A (BlaA) et B (BlaB) produites exclusivement par les souches appartenant aux sérogroupes O:3 et O:9. De rares souches présentent une résistance acquises à d'autres antibiotiques.

10. Traitement

Le traitement des diarrhées est souvent symptomatique: la diarrhée est avant tout un moyen de défense de l'individu qui élimine ainsi le pathogène. Le grand danger est la déshydratation qui s'y accompagne et doit être compensée. En cas de diarrhée bactérienne, l'antibiothérapie est nécessaire.

11. Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance de nature biologique, c'est à dire produite par des micro organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou chimique (de synthèse) et capable d'inhiber la multiplication ou de tuer des bactéries. Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères: l'origine, la nature, le mode d'action et le spectre d'action.

11.1. Les bêta-lactamines

Les bêta-lactamines (β -lactamines) forment une large classe d'antibiotiques qui comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de la β -lactamase. Ils possèdent un noyau (cycle bêta-lactame) qui est la partie active de la molécule. L'action antibactérienne des β -lactamines résulte de leur liaison aux protéines liant la pénicilline (PLP) et surtout, de l'inhibition des transpeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, composant fondamental de la paroi bactérienne. Les β -lactamines présentent une parenté structurale avec le dipeptide D-Alanine-D-Alanine constitutif de la paroi, ce qui leur permet d'inhiber l'action des enzymes associées à la synthèse du peptidoglycane.

11.2. Les glycopeptides

Les glycopeptides sont une famille d'antibiotiques qui s'attaquent au constituant principal des parois des bactéries, le peptidoglycane. Ils sont actifs sur les bactéries à Gram positif principalement sur *Staphylococcus* et *Enterococcus*. La vancomycine et la teicoplanine appartiennent à cette classe. Les glycopeptides ont une action sur la formation du peptidoglycane en effectuant un encombrement stérique, bloquant ainsi l'assemblage des précurseurs de la synthèse de la paroi, c'est-à-dire l'enchaînement d'acides aminés D-Alanine-D-Alanine et différents peptides. La cible des glycopeptides est le résidu D-Alanine-D-Alanine du peptidoglycane.

11.3. Les aminosides

Les aminosides se lient à la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries et interfèrent avec la traduction des ARN messagers en protéines. Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine) est lié à des modifications de la cible ribosomale par des enzymes codées par des gènes plasmidiques ou transposables. On distingue trois phénotypes de résistance (Quincampoix 2001):

- une résistance de haut niveau à la kanamycine et l'amikacine (phénotype K),
- une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine, à la tobramycine (phénotype KT),
- une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine, à la tobramycine, à la gentamicine (phénotype KTG).

11.4. Les phénicolés

Les phénicolés sont des antibiotiques essentiellement bactériostatiques. Ils sont des inhibiteurs de la synthèse protéique au niveau du ribosome bactérien. Ils exercent leur activité inhibitrice en entravant la fixation de l'ARN de transfert (ARNt) sur le ribosome. Les phénicolés ont pour cible la sous-unité 50S du ribosome procaryote entraînant l'inhibition de l'élongation du peptide en cours de synthèse. Le spectre d'activité du chloramphénicol inclut les bactéries aérobies et anaérobies à Gram positif et négatif ainsi que les spirochètes, les chlamyديات, les mycoplasmes, et les rickettsies. La famille des phénicolés comprend le chloramphénicol, le thiamphénicol, l'azidamphénicol, et le florfénicol. Une activité bactéricide pour le

chloramphénicol semble être possible sur certaines espèces bactériennes comme *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, et *Neisseria meningitidis*.

11.5. Les tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques qui agissent sur la synthèse des protéines bactériennes. Ils ont un large spectre, actifs contre certains types de streptocoques, de bacilles Gram négatifs, de rickettsies et de spirochètes. Elles sont aussi utilisées pour traiter les infections génitales, les infections urinaires, les bronchites et la maladie de Lyme. A cause de leur très large spectre d'action, les tétracyclines peuvent parfois modifier la flore bactérienne normale de l'organisme et être ainsi responsables d'infections secondaires du tube digestif ou du vagin. Leur emploi est aujourd'hui limité, en raison de l'apparition d'un nombre croissant de souches bactériennes résistantes.

11.6. Les sulfamides et associations

Les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques synthétiques à spectre large, actifs contre pratiquement toutes les bactéries Gram positives et de nombreuses Gram négatives. Cependant, la plupart de ces dernières ont développé une résistance aux sulfamides. C'est pourquoi ces antibiotiques sont réservés à des cas très spécifiques (infections urinaires, affections à méningocoques) et pour prévenir les fièvres rhumatismales. Les effets secondaires incluent des troubles gastro-intestinaux et des réactions allergiques.

11.7. Les macrolides, lincosamides et streptogramines

Les Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS) inhibent la synthèse protéique en stimulant la dissociation entre ribosome et ARN de transfert (Quincampoix 2001). Ils sont inactifs sur les entérobactéries. Les mécanismes de résistance aux macrolides (érythromycine, spiramycine), lincosamides (clindamycine) et streptogramines (pristinamycine, quinupristine-dalfopristine) comprennent la modification de la cible, des systèmes d'efflux et des enzymes inactivatrices. Le mécanisme le plus fréquemment en cause est la modification de la cible : le phénotype associant la résistance aux macrolides, aux lincosamides et au composé B des streptogramines (phénotype MLSb constitutif).

11.8. Les Quinolones et fluoroquinolones

Les quinolones ciblent l'ADN gyrase et les topoisomérase II et IV, empêchant la réplication

de l'ADN bactérien. La plupart des entérobactéries sont sensibles aux quinolones (acide nalidixique et acide pipémidique) mais aussi aux fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine). La résistance à ces molécules est due à une modification de la cible, liée à des mutations chromosomiques dans les gènes *gyrA* et *parC* codant respectivement pour l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Un autre mécanisme a été mis en cause, l'efflux actif des quinolones sous la dépendance du gène *norA* qui confère une résistance de bas niveau et concerne principalement les fluoroquinolones à caractère hydrophile (ciprofloxacine, ofloxacine) (Leclercq 2000).

12. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques peut intervenir par le biais d'un ensemble de mécanismes

- La modification de l'antibiotique: de nombreuses souches résistantes fabriquent une enzyme qui modifie ou qui clive la molécule d'antibiotique, la rendant inactive. C'est le mécanisme principal de résistance aux β -lactames qui implique les enzymes de la famille des β -lactamases:

- La réduction de la perméabilité membranaire: la bactérie "ferme" les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Ces pores sont normalement constitués par des protéines qui forment de canaux et que l'on appelle des porines. Les bactéries résistantes réduisent leur nombre de porines.

- La modification de la cible de l'antibiotique: une enzyme spécifique effectue une modification chimique covalente de la cible, par exemple une méthylation, ce qui inhibe la fixation de l'antibiotique, comme dans le cas précédent, mais sans qu'il y ait altération du génome. Ce type de mécanisme est rencontré dans la résistance aux macrolides, où il existe une méthylase qui confère la résistance en modifiant l'ARN ribosomique au niveau du site de liaison de l'antibiotique.

- La mutation de la cible de l'antibiotique: chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise dans la cellule (paroi, ribosome etc.). La présence d'une modification consécutive à une mutation modifie le site de fixation et empêche ainsi la liaison de l'antibiotique.

- La surexpression de la cible de l'antibiotique: en produisant davantage de la macromolécule ciblée, la bactérie arrive à maintenir suffisamment d'activité biologique pour se développer, malgré la présence de l'antibiotique.

- L'efflux des antibiotiques: les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par pompage actif hors de la cellule, qui expulse littéralement les composés toxiques au dehors.

Ces mécanismes de résistance peuvent coexister chez une même bactérie et agir en

« synergie », conférant une résistance plus élevée aux antibiotiques d'une même famille mais également à des antibiotiques de familles différentes (cas de la perméabilité) (Pantosti 2007). Ce mécanisme est rencontré le plus souvent dans la famille des quinolones.

13. Types de résistance

13.1. Résistance naturelle

La résistance est naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. Son support est le chromosome. La résistance naturelle traduit l'expression d'une propriété innée reflétant l'empêchement d'accéder à la cible ou une absence de la cible.

13.2. Résistance acquise

La résistance est acquise lorsque quelques souches d'une même espèce normalement sensibles deviennent résistantes. Cette résistance peut-être due à :

- des mutations affectant les gènes présents sur le chromosome
- l'acquisition de gènes étrangers, véhiculés par des éléments génétiques mobiles transférables d'une bactérie à une autre.

13.3. Modalités de résistance chez la bactérie

Les bactéries développent plusieurs mécanismes de résistance pour contrer l'action des antibiotiques.

13.3.1. Le camouflage

L'antibiotique se fixe sur une cible déterminée de la bactérie. Celle-ci peut remplacer ou modifier la cible de l'antibiotique. Dans ce cas, l'antibiotique n'est plus reconnu et la bactérie devient insensible à l'antibiotique. Ce type de résistance est retrouvé contre les macrolides.

13.3.2. Le brouillage

Avant sa pénétration, la bactérie peut synthétiser des protéines qui peuvent séquestrer l'antibiotique ou le dégrader pour le rendre inoffensif (hydrolases, transférases...). Ce brouillage qui est une action offensive peut se faire à l'extérieur (exemple des bêta-lactamases sur les antibiotiques de la famille des pénicillines) de la cellule, comme à l'intérieur.

13.3.3. Le blindage

La bactérie empêche l'accès de l'antibiotique aux cibles intracellulaires, par une modification de la perméabilité membranaire ou par un efflux actif. La bactérie met en place un système d'expulsion de l'antibiotique en modifiant les porines ou en diminuant leur spécificité. Une pompe membranaire refoule l'antibiotique qui entre dans la cellule.

13.3.4. L'esquive

La bactérie substitue une autre molécule à la cible. L'antibiotique, en se fixant sur ce site se leurre et ne peut pas remplir son rôle.

13.3.5. La constitution en biofilm

La bactérie se recouvre d'une couche de protection, la rendant inaccessible à l'antibiotique.

13.4. Transfert des gènes de résistance

Les bactéries peuvent transférer des éléments mobiles de leur génome : plasmides, transposons et intégrons.

13.5. Les modes de transfert

13.5.1. Le transfert vertical

Il s'effectue entre bactéries de même espèce. Les gènes de résistance sont transmis à la descendance.

13.5.2. Le transfert horizontal

Il intervient le plus souvent dans les échanges entre bactérie Gram+, Gram- ou dans le sens Gram+ vers Gram-. L'inverse, Gram- vers Gram+, n'est pas réalisable car les gènes de Gram- ne sont pas exprimés chez Gram+. Les transferts horizontaux de gènes jouent un rôle important dans la dissémination des mécanismes de résistance aux antibiotiques entre espèces bactériennes. Ils repoussent les limites liées à la transmission verticale des gènes et des mutations pendant la division cellulaire. Pour que le transfert horizontal de matériel génétique soit efficace, plusieurs étapes sont nécessaires : l'ADN, support de l'information génétique, doit être transféré de la cellule donneuse à la cellule réceptrice (étape intercellulaire) ; la séquence ADN doit s'intégrer soit au génome (chromosome), soit sur une structure se répliquant de façon autonome (plasmide) ; les gènes apportés par ce fragment d'ADN doivent

ensuite être capable de s'exprimer dans la cellule réceptrice. Les bactéries utilisent trois mécanismes principaux de transfert horizontal d'éléments génétiques entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces et de genres différents : la transformation, la transduction et la conjugaison.

13.6. Les mécanismes de transfert

13.6.1. La transduction

La transduction est un transfert d'ADN entre bactéries par l'intermédiaire de bactériophages. En se répliquant, le phage intègre une partie du génome bactérien du premier hôte. En quittant la cellule, il emporte des gènes supplémentaires (bactériens) qui pourront être transférés dans une autre bactérie hôte. Ce processus est extrêmement efficace du fait de la protection de l'ADN dans les particules virales et de la performance de délivrance par les phages de l'ADN d'une bactérie à une autre. Mais les échanges sont limités en taille (le phage ne peut pas transférer un long morceau d'ADN bactérien) aux organismes proches phylogénétiquement pour la reconnaissance phage / bactérie. Il existe deux modes de transduction : le mode virulent appelé lytique et le mode tempéré ou lysogène.

13.6.2. La transformation

C'est un processus par lequel la bactérie acquiert et incorpore de manière définitive de l'ADN libre et présent dans son environnement. Cela peut être de l'ADN d'une bactérie morte qui, une fois capté, permet l'expression de ses gènes par la nouvelle bactérie. C'est un événement très rare qui existe chez les bactéries Gram-. La transformation est le premier mécanisme d'échange génétique rapporté chez les bactéries.

13.6.3. La conjugaison

La conjugaison est un mode de transfert horizontal et unidirectionnel par un mécanisme requérant un contact cellulaire étroit (par un pili). L'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. C'est un processus de transfert génétique entre bactéries de même Gram ou à Gram différent et de genres différents. Le mécanisme est beaucoup plus décrit chez les bactéries à Gram négatif. Les gènes codant les fonctions nécessaires à la conjugaison sont portés uniquement par la bactérie donatrice sur le support d'éléments génétiques mobiles que sont : les plasmides conjugatifs et les transposons conjugatifs.

13.7. Dissémination de la résistance

Les bactéries acquièrent la résistance grâce à des éléments génétiques élaborés. La dissémination de cette résistance est liée par les plasmides, les transposons et plus récemment les intégrons. La dissémination des gènes de résistance nécessite leur présence sur des supports génétiques pouvant être transmis à la descendance (transfert vertical) et capables de diffuser horizontalement d'une bactérie à une autre. Les deux supports génétiques capables de se répliquer et donc transmis aux cellules-filles sont le chromosome et les plasmides.

13.7.1. Le chromosome

La résistance chromosomique aux antibiotiques peut être due soit à la présence de gènes de résistance soit à des mutations. La résistance par mutation présente une transmission verticale, elle apparaît à une fréquence de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-10} par génération. La résistance chromosomique par mutation est généralement due à des modifications de la cible de l'antibiotique, ou à des dé-répressions de systèmes d'efflux intrinsèques habituellement réprimés.

13.7.2. Les plasmides

En plus de l'ADN chromosomique, les bactéries peuvent héberger d'autres molécules extra chromosomiques tels que les plasmides (Watson 1992). Les plasmides sont des molécules d'ADN bi caténares, circulaires, extra chromosomiques permettant le transfert horizontal ou vertical de gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries qui peuvent être éloignées sur le plan phylogénétique (Courvalin 1997). Ils peuvent se répliquer et possèdent un site régulateur du nombre de copie et de gènes qui codent une ou plusieurs fonctions selon les plasmides : résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (plasmide R) (Willets 1984; Curtis 1997), transfert chromosomique (plasmide F), production de colicine (plasmide Col). Chez les procaryotes, les plasmides ne sont pas indispensables à la vie. Néanmoins, ils permettent soit une meilleure adaptation à l'environnement défavorable ou fluctuant, soit une implantation dans certains hôtes, soit une compétition avec certains micro-organismes. Deux types de plasmides ont été définis suivant le nombre de copies par cellule:

- Les plasmides non conjugatifs dont les gènes régulateurs du nombre de copies par cellule ne sont pas soumis à un contrôle stringent (Courvalin 1997). Ces types de plasmides n'ont pas de fonction connue dans la résistance aux agents antibactériens. Ils ne peuvent être transférés d'une bactérie à une autre que par mobilisation.

- Les plasmides conjugatifs ou plasmides R qui ont leur site de régulation soumis à un contrôle stringent. Ces types de plasmides sont présents en une seule copie par cellule et leur réplication est indépendante de celle de l'ADN génomique. Les plasmides de résistance R se caractérisent par leur autoréplication, leur autonomie physique, ils peuvent être séparés de l'ADN par ultracentrifugation sur gradient de densité et leur perte spontanée à faible fréquence à température ambiante (37°C).

La plupart des plasmides de résistance sont transférables d'une bactérie à une autre par contact (Curtis 1997). De tels plasmides possèdent un gène codant pour la synthèse de pili sexuel (appendice protéique) et un opéron TRA regroupant une vingtaine de gènes qui codent pour de nombreuses protéines nécessaires à la conjugaison bactérienne.

Les plasmides R renferment aussi d'autres gènes qui codent pour des fonctions telles que : la méthylation, l'inhibition de l'influx, l'acétylation, la phosphorylation et l'adénylation de groupements fonctionnels (Witchitz 1982). Les plasmides portant les intégrons se retrouvent chez les entérobactéries.

Trois grands mécanismes sont impliqués dans la dissémination des plasmides :

- Conjugaison qui nécessite un contact bactérien au cours duquel il y a échange de matériel génétique entre une bactérie mâle donatrice et une bactérie femelle réceptrice.

- Transduction : transfert d'ADN bactérien par un bactériophage.

- Transformation : intégration et expression de séquence génomique étrangère en l'absence de toute homologie de séquence. Elle est rare chez les bactéries.

13.7.3. Transposons

Les transposons sont des éléments mobiles d'ADN (gènes sauteurs) capables de se transférer entre un chromosome et un plasmide ou entre deux plasmides (Roy 1997). Les transposons ont une organisation fonctionnelle. Ce sont des unités autonomes, codant des protéines nécessaires à leur transposition.

Suivant leur structure les transposons peuvent être simples ou complexes.

- Les transposons simples sont constitués uniquement de séquences d'insertion (IS) qui sont autonomes et codent pour une protéine nécessaire à leur mobilité. Les IS sont des éléments de petite taille (750 à 2500pb) présentant une organisation très compacte. Ils présentent à leurs extrémités de courtes séquences inversées répétées (IR) de 10 à 40 pb suivi de séquences de répétition directe (Lewis 1992). Ces IR sont des séquences d'ADN actives et encadrent une phase ouverte de lecture qui code la transposase.

Chapître I. Généralités

- Les transposons complexes sont constitués d'une région centrale qui porte un ou plusieurs marqueurs de résistance aux antibactériens bordés de chaque côté par un module IS (Lewis 1992).

Les modules IS bordant les gènes de résistance peuvent être dans la même orientation (répétition directe) ou en orientation opposée (répétition indirecte). La région centrale en plus des marqueurs de résistance possède un gène codant pour la transposition. La transposase reconnaît les répétitions terminales inversées (RTI) des modules IS et effectue à leur niveau une coupure en bout cohésif. Cette coupure permet l'ouverture du transposon à partir de laquelle se fait la réplication de la région limitée par les séquences d'insertions.

Les transposons sont répartis en familles suivant leur organisation fonctionnelle. Ainsi trois familles ont été décrites (Courvalin 1997).

- La famille des transposons simples

Ces transposons forment une famille très homogène et sont majoritairement retrouvés chez les bactéries à gram négatif sauf le Tn551 et le Tn917 qui ont été retrouvés respectivement chez *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. La structure fonctionnelle de cette famille montre la présence des gènes de la transposase, de la β -lactamase en plus des séquences d'insertion.

- La famille des transposons composites

Ce sont des structures moléculaires dans lesquelles un ou plusieurs gènes sont encadrés par des copies IS. Il n'existe aucune homologie entre les IS bordant les gènes de résistance. La synthèse de la transposase par l'une des deux IS entraîne la translocation complète du transposon. Les plus rencontrés dans cette famille sont les Tn5, Tn9 et Tn10 auxquels sont associés des gènes de résistance aux antibiotiques.

L'élément SXT: *V.cholerae* possède un élément conjugatif intégratif (ICE) appelé SXT de 62 kb qui porte les gènes de résistance au sulfaméthoxazole, au triméthoprime, au chloramphénicol et à la streptomycine. Cet élément a été initialement détecté dans le sérotype émergent O139 de *V.cholerae*, mais des éléments très proches ont été retrouvés dans tous les autres isolats cliniques. L'élément SXT s'intègre de manière spécifique aussi bien chez *V.cholerae* O139, *V.cholerae* EI Tor O1 que chez *E.coli* K-12 (Hochhut 2001). Pour l'élément SXT de *V.cholerae*, 9 sites secondaires d'intégration ont été détectés et l'un d'entre eux, la terminaison 5' du gène *pntB* est une cible fréquente lorsque le site d'intégration dans la terminaison 5' du gène *prfC* est absent. Lorsque SXT est intégré dans le gène *pntB*, il est encore transmissible mais avec une fréquence 10 fois moins importante. L'existence de sites alternatifs pour des éléments qui semblent intégrer des sites spécifiques permet d'élargir leur

spectre d'hôte (Burrus 2003). SXT est le seul élément pour lequel on a prouvé qu'il possédait des gènes codant pour des pili sexuels proches de ceux de plasmides conjugatifs. En effet, SXT possède des gènes proches de ceux du plasmide F qui codent pour l'assemblage des pili et la formation du pore d'accouplement. De plus, récemment on a montré que les produits de gènes codés par l'élément SXT essentiels pour l'assemblage des pili et la préparation de l'ADN au transfert étaient similaires à des systèmes de conjugaison trouvés dans plusieurs autres bactéries Gram-.

On rencontre aussi des transposons non composites : ce sont des transposons sans IS mais avec des IR de 35 à 48 pb aux extrémités. Leur taille est variable pouvant aller jusqu'à 70kb pour Tn4651. Ils contiennent des gènes de transposition mais également d'autres marqueurs tels que des gènes de résistance comme les transposons composites. Le transposon le plus caractérisé est le Tn3.

- La famille des transposons conjugatifs

Ils forment une famille homogène. Le plus petit de ces éléments le Tn916 a une taille de 18,4kpb et les plus importants peuvent atteindre 100 kpb. Cette famille est classée dans les grands éléments transposables (ET). Leur mécanisme est similaire à la conjugaison bactérienne. Dans cette famille, l'élément le mieux caractérisé est le Tn1545. L'anatomie fonctionnelle de ce transposon montre qu'il n'est pas flanqué de IS et ne possède pas de RTI à ses extrémités (Courvalin 1997).

Deux types de transposition ont été décrits :

La transposition conservative qui se fait par l'intermédiaire d'une coupure double brin de part et d'autre du transposon. Dans ce cas, le réplicon donneur perd totalement l'ADN situé entre les IR internes au profit du receveur. Le réplicon donneur est alors cassé (Lewis 1992).

La transposition répllicative qui se fait par l'intermédiaire d'une coupure simple entre le réplicon donneur et le site du receveur.

Les transposons comme les plasmides peuvent héberger des intégrons.

13.7.4. Les intégrons

Au cours des années 80, de nouveaux éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques ont été décrits et désignés sous le nom d'intégrons (Stockes 1989). Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison de site spécifique médié par une

intégrase (Ploy 2000). Les intégrons sont incapables de se répliquer et sont portés par le chromosome ou le transposon ou le plasmide.

13.7.4.1. Structure des intégrons

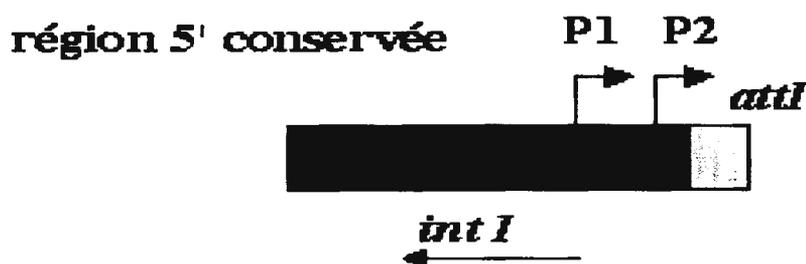


Figure 14 : Région 5' conservée des intégrons (Stockes 1989)

Les intégrons sont constitués :

- d'une région 5' conservée contenant un gène *intI* qui code pour une intégrase (Stockes 1989), d'un ou de deux promoteur (P1, P2). Ce gène est adjacent à un site spécifique de recombinaison attI. La région promotrice du gène *intI* n'a jamais été caractérisée quelque soit la classe d'intégron. Chez les intégrons de classe 1, un promoteur a été suspecté mais son activité n'a jamais été démontrée expérimentalement (Ploy 2005). Les sites attI des différentes classes d'intégrons n'ont pas de séquence commune excepté le motif GTTRRRY (R :purine ; Y : pyrimidine) (Hanson 2002). Le site attI constitue le « core site » qui est le point d'insertion des cassettes. Cette région est nécessaire au fonctionnement de l'intégron.
- d'une région variable qui héberge une ou plusieurs cassettes
- et d'une région 3' qui n'est pas présente chez toutes les classes d'intégrons.

Plusieurs classes d'intégrons ont été décrites en fonction de la composition en acides aminés de l'intégrase (Stockes 1989). Trois d'entre elles ont été bien caractérisées et sont impliquées dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

13.7.4.2. Structure des cassettes

Les cassettes ont des tailles et des fonctions variables et possèdent une organisation commune. Une cassette est constituée d'un gène de résistance aux antibiotiques adjacent à un site spécifique de recombinaison attC reconnu par l'intégrase. Le site attC est constitué de séquences relativement conservées, inversées, répétées, imparfaites dont la taille varie de 57 à

141 paires de bases. La longueur d'une cassette varie de 262 à 1549 paires de base (pb) (Recchia 1995). Deux séquences répétées, inversées de sept paires de bases sont constamment retrouvées aux deux extrémités et désignées core et core inverse.

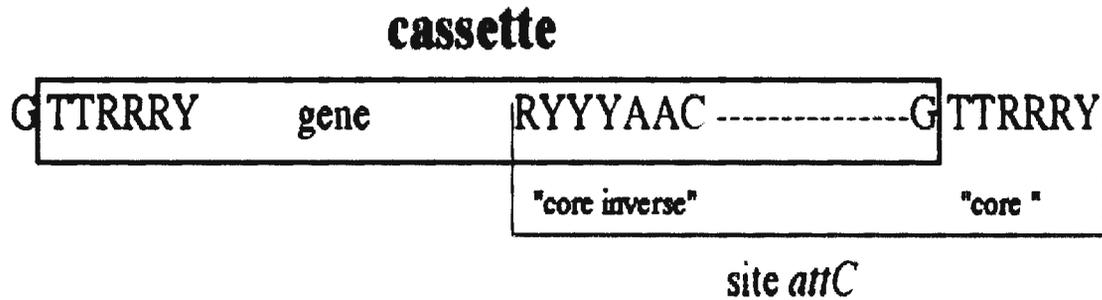


Figure 15 : Structure d'une cassette (Recchia 1997)

Le premier site attC à être décrit avait 59 paires de base d'où l'appellation << élément 59pb>>. Cette appellation est aujourd'hui erronée puisque toutes les études ultérieures ont montré que cette région peut avoir une longueur très variable (Stockes 1989).

13.7.4.3. Mouvement des cassettes

Il a été démontré que les cassettes intégrées sous forme linéaire peuvent, après excision générer une forme libre circulaire. Le mouvement des cassettes se fait donc essentiellement par insertion-excision sous forme circulaire entre deux sites spécifiques catalysé par l'intégrase (Collis 1992). L'intégration des cassettes se fait préférentiellement par recombinaison entre le G du site attI de l'intégron et le T du site attC de la cassette (Collis 2001). Les cassettes sont intégrées seules ou en tandem. La recombinaison d'une deuxième cassette se fait le plus souvent entre deux sites spécifiques et se produit entre le G d'un site core GTTRRRY et le T d'un deuxième site core mais se fait préférentiellement avec le T du site attI. L'événement de recombinaison peut impliquer un site spécifique et un site non spécifique lequel est dit site secondaire. Ces sites secondaires ont généralement la séquence GWTMW (W : T/A ; M : A/C) qui présente des similitudes avec le core GTTRRRY (De la Cruz 1993). C'est ce qui fait que la recombinaison est stable.

L'originalité des cassettes est qu'elles peuvent s'insérer ou s'exciser l'une à la suite de l'autre dans l'intégron. Elles permettent ainsi la construction de cellules conférant de multiples résistances.

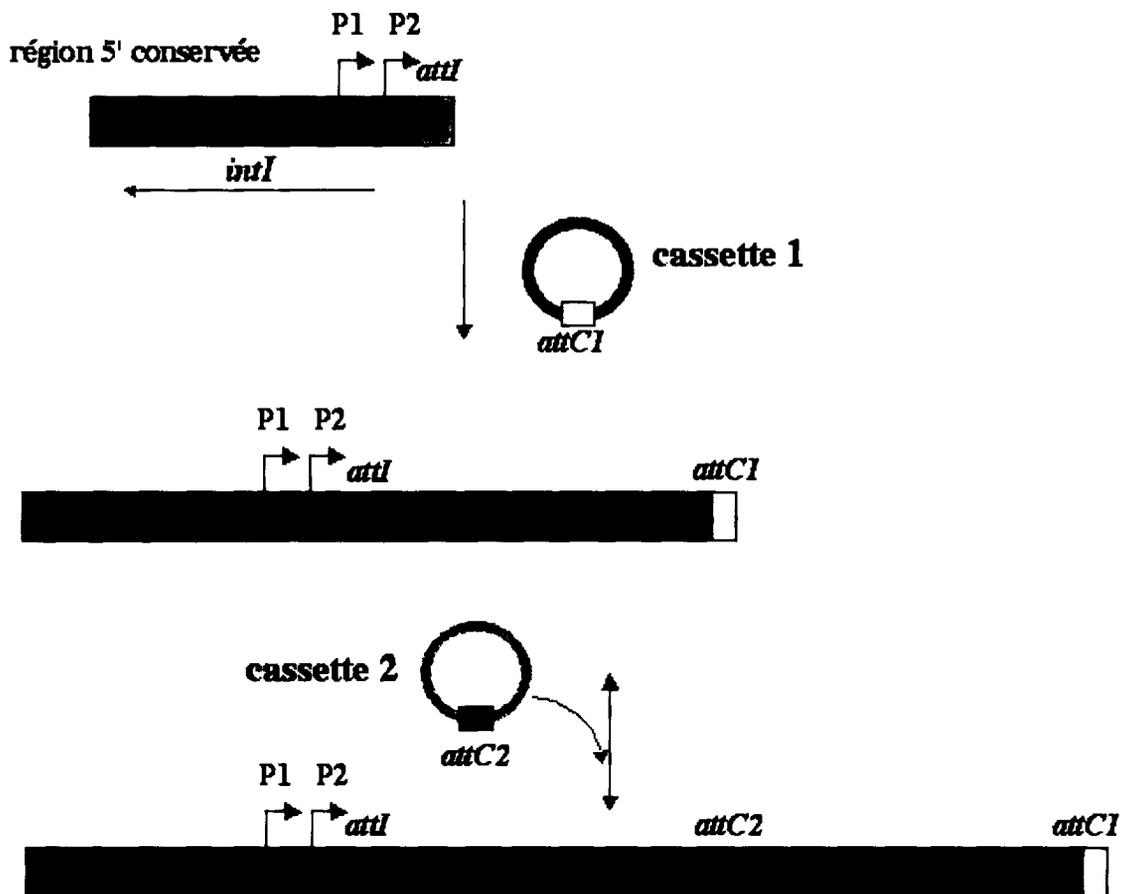


Figure 16 : Insertion-excision des cassettes (Collis 1992)

13.7.4.4. Expression des cassettes

Les cassettes sont toutes orientées dans la même direction mais sont pour la plupart dépourvues de promoteur (Ploy 2000). La transcription des gènes est sous la dépendance d'un promoteur localisé dans la région 5' conservée en amont et leur expression est tributaire de la position du promoteur. Les gènes localisés dans des cassettes éloignées du promoteur sont faiblement exprimés à cause de leur éloignement de celui-ci (Collis 1995).

La pression de sélection des antibiotiques peut favoriser des réarrangements de cassettes afin de permettre le positionnement d'une cassette faiblement exprimée à une position plus proche du promoteur. De rares cassettes possèdent leurs propres promoteurs tels que *cmIA*, *cmIA2* et codant la résistance au chloramphénicol et *ereA2* codant la résistance à l'érythromycine (Ploy 2000). Certains intégrons peuvent être dépourvus de cassettes tel In0 et ne contenir que les régions 5' et 3' et le site spécifique de recombinaison *attI* (Martinez-Freijo 1999).

13.7.4.5. Les principales classes d'intégrons

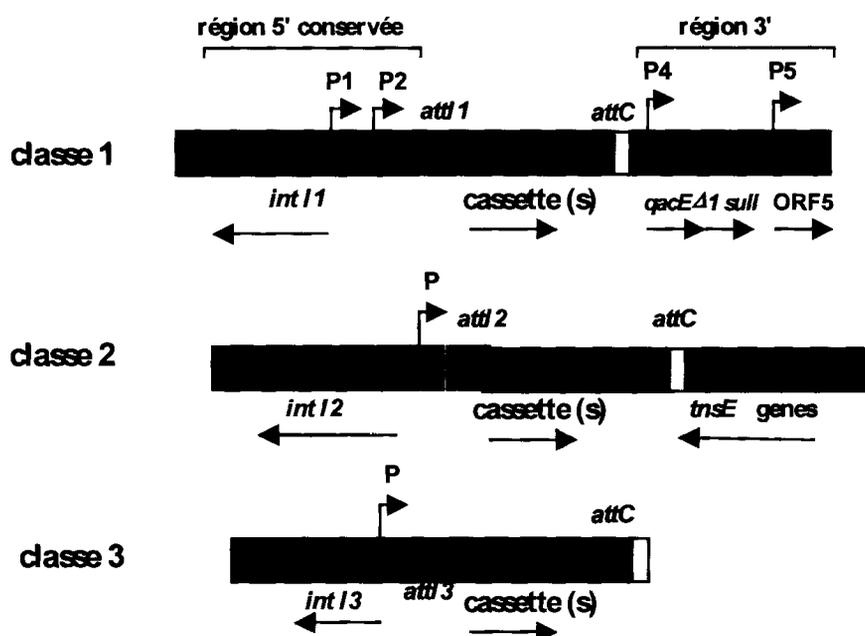


Figure 17 : Structure des trois principales classes d'intégrons de résistance

a) Les intégrons de classe 1

Les intégrons de classe 1 sont les mieux caractérisés des intégrons et ont été retrouvés chez la presque totalité des entérobactéries d'importance clinique (Fluit 1999) mais aussi chez quelques bactéries à gram positif (Silly 2002) ou provenant de l'environnement. Les intégrons de classe 1 ont été retrouvés sur les transposons Tn21, Tn3, Tn402 (encore appelé In16 ou Tn5090), In111 (Vourly 2003), Tn1404, Tn1405 (Silly 2002) et les transposons défectifs In0, In2, In10, In4, In5, In56 et In31 (Brown 2000).

La région 5' de cette classe d'intégron est formée d'un gène *int1* qui code pour une intégrase de recombinaison des cassettes de 337 acides aminés. La région 3' possède trois cadres de lectures ouverts (Stockes 1989) que sont:

- *QacEΔ1* qui est un dérivé délété d'un gène *QacE* codant la résistance aux ammoniums quaternaires.
- *SulI* qui est un gène de résistance aux sulfamides
- *ORF5* qui est un gène dont la fonction n'est pas encore connue.

L'intégron de classe 1 est très fréquent chez les entérobactéries (White 2001).

On rencontre une variabilité des cassettes conférant la résistance à une multitude de familles d'antibiotiques.

Sur le transposon Tn402, on retrouve parfois à la place de Orf5 un gène *tni* codant pour une transposase (Vourly 2003).

b) Les intégrons de classe 2

Les intégrons de classe 2 ont été retrouvés sur le transposon Tn7. Ces intégrons ont été retrouvés aussi sur les transposons Tn1825, Tn1826 (Tietze 1987; Vourly 2003) et Tn4132 (Young 1994). La région 5' code pour une intégrase de 325 acides aminés et présente près de 46% d'homologie avec l'intégrase IntI1 (Sundström 1990). L'intégrase intI2 n'est pas fonctionnelle car interrompue par des codons stop TAA (Hanson 2002). La région 3' des intégrons de classe 2 est composée de gènes *tns* impliqués dans la transposition de Tn7 (Figure 19). La présence de ces gènes fait que la transposition des cassettes est plus importante dans cette classe d'intégron. Sur le transposon Tn7 on trouve très souvent trois types de cassettes dont la première code pour une résistance au triméthoprim (*dfrA1*), la seconde code pour une résistance à la streptothricine (*sat*) et la troisième qui code pour une résistance à la streptomycine (*aadA1*) (Sundström 1991). Une quatrième cassette *orfx* dont la fonction est inconnue a été récemment décrite sur Tn7. Sur Tn1825 (Figure 19), une cassette supplémentaire de fonction inconnue est localisée à la première position. Par contre sur Tn1826 (Figure 19) on ne trouve pas de cassette *dfrA1*. Sur le transposon Tn4132b, *dfrA1* est remplacé par la cassette *dfr-Ib* (Sundström 1990). Une analyse comparative des sites de recombinaison attI de intI2 montre que celui de Tn7 est moins exigeant que celui de Tn21 (Hanson 2002). Le séquençage complet de intI2 sur Tn7 montre qu'il est étroitement apparenté à IntI1 de Tn21 et ressemble également à l'intégrase de classe 3 (Arakawa 1995). Il a été montré que l'intégrase de classe 2 peut promouvoir une recombinaison entre différents sites de recombinaison des cassettes présents sur le même plasmide (en vue d'une excision) s'il change la terminaison de leur codon stop en codon sens par altération de leur triplet GAG qui code pour l'acide glutamique.

Des études menées chez *Acinetobacter baumannii* en France ont montré des intégrons hybrides présentant intI2 dans leur région 5' et une région 3' formée de la région 3' des intégrons de classe 1 (Ploy 2000).

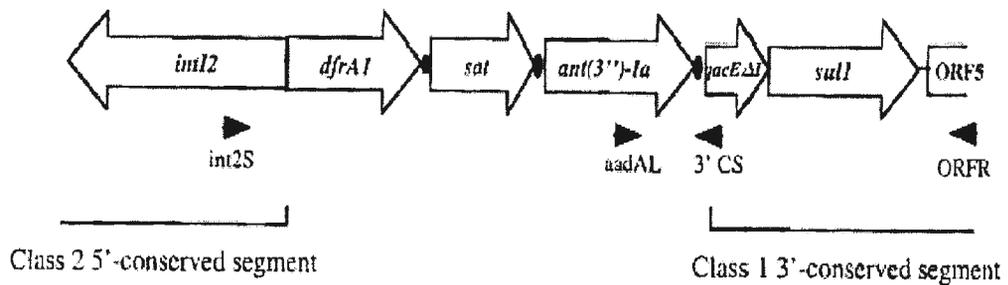


Figure 18 : Intégron de classe hybride (Ploy 2000)

Des études plus récentes ont montré des intégrons de classe 2 contenant un arrangement différent de cassettes. Cet intégron de classe 2 a été localisé sur le plasmide pIP1100 avec la présence de la cassette *ere(A)* codant la résistance à l'érythromycine en plus des autres cassettes avec la disposition suivante: *sat*, *ere(A)*, *aadA1* et *orfX*. Cet intégron est caractérisé par la présence d'une séquence d'insertion IS1 localisée en amont de l'intégrase 2 à 10pb et à 310pb du site de recombinaison attI2 (Biskri 2003) (voir Figure 18)

Des études faites sur des salmonelles au Japon ont permis de décrire la présence d'un nouveau type d'intégron de classe 2. Sur cet intégron, en plus des cassettes associées au transposon Tn7 que sont *dfrA1*, *sat*, *aadA1*, la cassette *ereA* remplace *dfrA1* mais elle est localisée entre *sat1* et *aadA1*. La longueur des cassettes de cet intégron est de 2,9 kb. Un nouvel intégron de classe 2 a été identifié aussi chez deux souches de *Salmonella Enteritidis* avec la présence de la cassette *sat* qui remplace *dfrA1*. Ce nouvel intégron a une taille de 2,5 kb avec les cassettes *sat*, *sat1*, et *aadA1* (Ahmed 2005).

Un intégron de classe 2 a été décrit chez *Acinetobacter baumannii* avec un nouvel arrangement de cassettes. L'analyse de cet intégron révèle la duplication de la cassette *sat2* suivie de deux nouvelles cassettes *aadB* codant la résistance à la gentamicine, à la kanamycine et la tobramycine et *catB2* codant la résistance au chloramphénicol. Cet intégron est constitué donc des cassettes *sat2-aadB-catB2-dfrA1-sat2-aadA1-orfX* (Ramirez 2005).

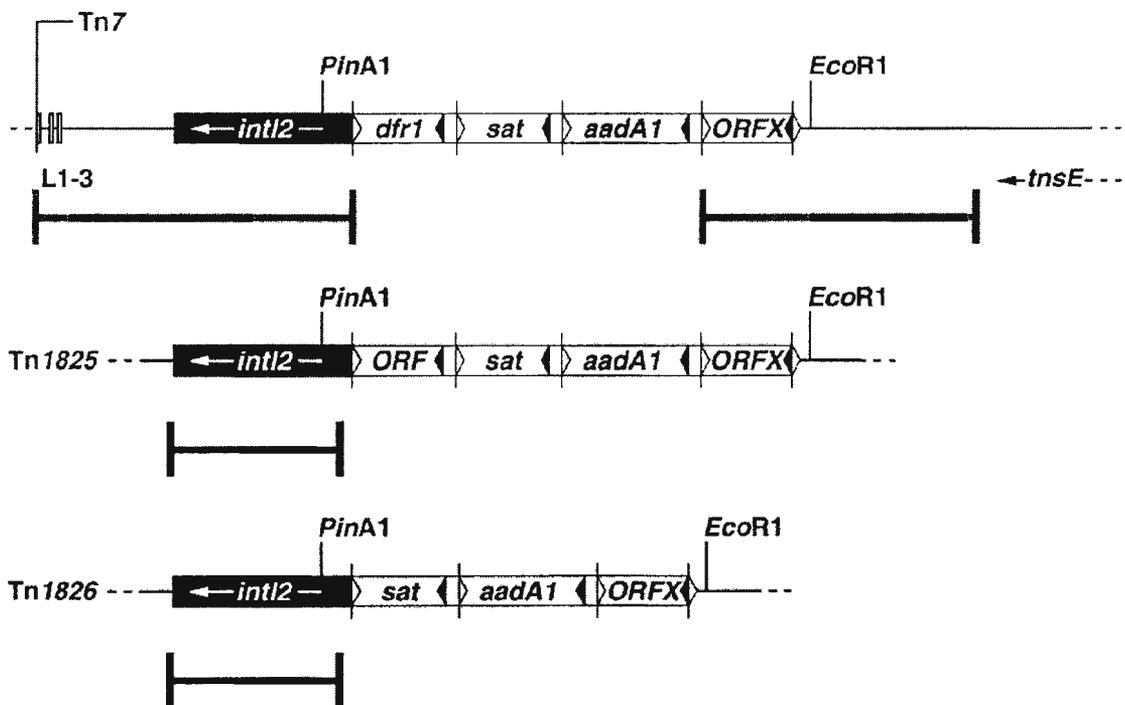


Figure 19 : Maps of the integron regions in Tn7 and in the related transposons Tn1825 and Tn1826 (Hanson 2002)

c) Les intégrons de classe 3

Le premier intégron de classe 3 a été caractérisé chez *Serratia marcesens* (Arakawa 1995; Collis 2002). Cet intégron est constitué dans sa région 5' d'un gène *intI* associé à un promoteur et recombinaison à un site *attI* (Collis 2002). L'intégrase 3 présente 61% d'homologie avec *intI1* (Arakawa 1995). Un intégron de classe 3 a été identifié chez *Klebsiella pneumoniae* et qui présente une résistance aux céphalosporines (Correia 2003). Il possède une région 5'CS qui a 98,8% d'homologie avec la région 5'CS de l'intégron de classe 1 de *S. marcesens*. Il possède en outre deux promoteurs et au niveau du site *attI* s'insère la cassette *bla_{GES-1}* et un autre provenant de la fusion des cassettes *bla_{oxa-10}* et *aac(6')-Ib*. Des expériences d'hybridation de cet intégron ont montré qu'il est situé sur le plasmide pRM808 et qu'il peut héberger la cassette *aadA2* et *aacA4* (Correia 2003).

Malgré les différences des intégrases et des sites *attI*, les mêmes cassettes de gène peuvent être insérées dans ces "trois classes" d'intégrons, ce qui indique que ces différentes intégrases utilisent un ensemble commun de cassettes de gène (Carattoli 2001).

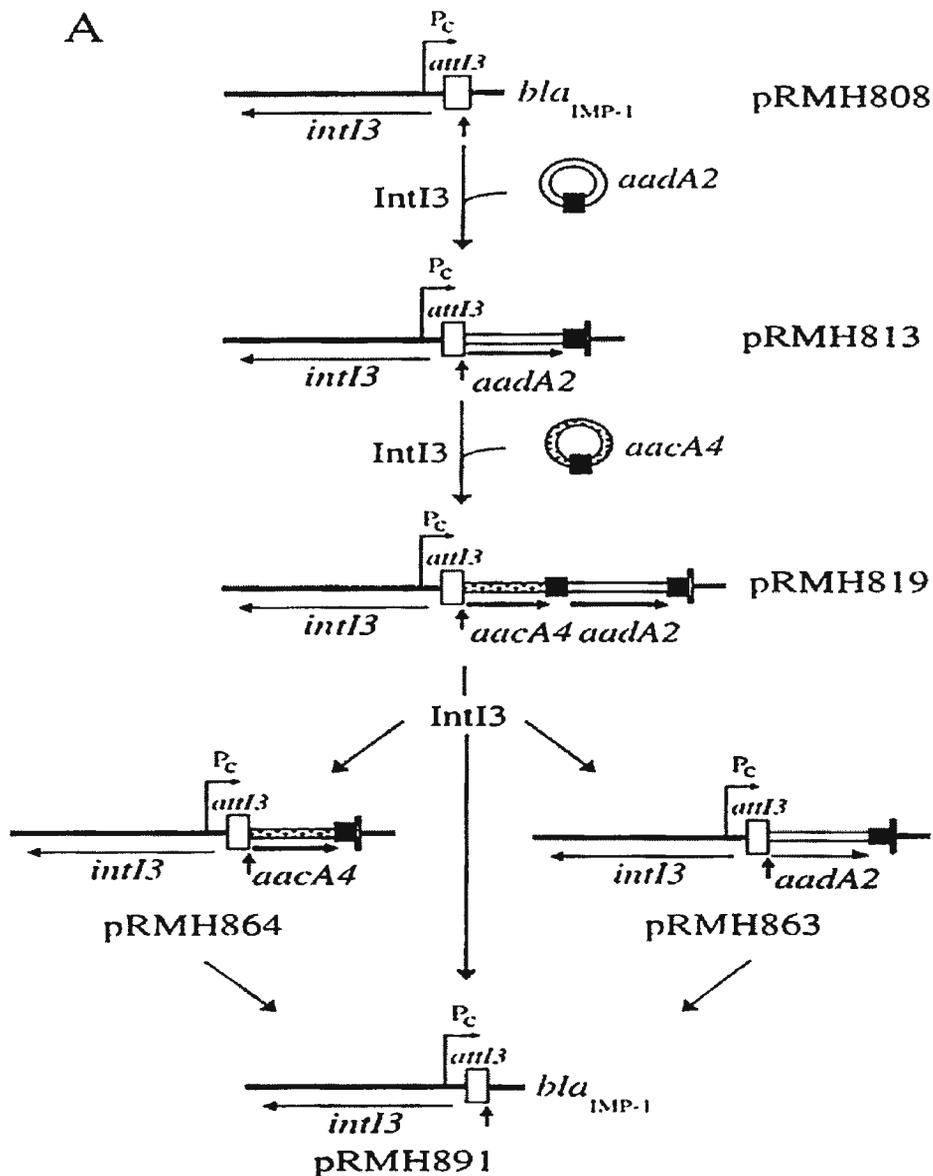


Figure 20 : Mécanismes d'insertion et d'excision des cassettes de l'intégron de classe 3 (Correia 2003)

d) Les Super-intégrons

Les Super-intégrons ont été caractérisés sur le génome de différentes espèces de *Vibrio* (*Vibrio cholerae*, *V.minicus*, *V.parahaemolyticus* etc...) mais aussi chez d'autres genres bactériens (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Shewanella*) (Rowe-Magnus 1999). Les études montrent qu'il présente une région 5'CS qui code pour une intégrase présentant 40 à 50% d'identité avec les trois autres intégrases. Ils possèdent également un gène *intI* ayant 50% d'identité avec *IntI1*, *IntI2*. En amont du gène *intI4* il a été retrouvé des séquences appelées VCR (*Vibrio cholerae* repeated sequence) et en aval un gène codant pour un amas de

protéines ribosomales (Barker 1994). La majorité des cassettes de gène identifiées dans les "Super-Intégrons" et notamment chez *V. cholerae* n'ont pas de fonction connue. Les cassettes identifiées confèrent une fonction adaptative pouvant être soit impliquée dans la virulence (gènes de virulence potentiels, toxines), soit dans la résistance aux antibiotiques (gènes codants des homologues à différentes enzymes de modification), ou encore dans différentes fonctions métaboliques. Les super intégrons ont une structure identique à celle des intégrons de résistance aux antibiotiques mais différent de ceux-ci par le fait que:

- les super intégrons ont une très grande taille et hébergent un grand nombre de cassettes (plus de 100 cassettes), qui pour la majorité ne confèrent pas de fonction connue et dont les sites attC présentent une importante homologie (VCR, *Vibrio cholerae* repeated sequence ; PAR, *Pseudomonas alcaligenes* repetitive DNA).
- les séquences VCR sont très conservées alors que les sites attC sont variables.
- les super intégrons sont spécifiques à l'espèce, contrairement aux intégrons.
- les cassettes des super intégrons ne codent pas pour une fonction connue alors que celles des intégrons codent pour la résistance aux antibiotiques.
- les super intégrons constitueraient donc un système d'adaptation aux différentes pressions de l'environnement.
- les "Super-Intégrons" représentent des intégrons "sédentaires" sur le chromosome,

13.7.4.6. Origine des intégrons

L'origine des intégrons constitue une énigme. Néanmoins des hypothèses ont été avancées :

- La première hypothèse est que, la présence de séquence palindromique au niveau du site attC dans la région 5' de la cassette laisse croire que les intégrons proviendraient d'une transcription inverse à partir d'ARNm (Recchia 1997). Cependant, certaines observations vont à l'encontre de cette hypothèse et suggéreraient une origine différente pour les gènes et les sites attC dont la taille et la séquence sont très variables.
- La deuxième hypothèse est que les intégrons auraient évolués à partir des « super intégrons ». De nouvelles études ont montré que les « Super intégrons » sont reconnus par l'intégrase intI1. C'est ce qui suggère que les intégrons ont des fonctions proches de celles des « super intégrons » (Mazel 1998).

Les intégrons de résistance aux antibiotiques auraient évolué à partir de super intégrons par le biais de la capture d'un gène *intI* et d'un site attI dans les structures mobiles de type transposon et que sous l'effet de la pression de sélection antibiotique, il y aurait eu capture de

gènes de résistance provenant des pools de cassettes contenus dans différents super intégrons (Rowe-Magnus 1999).

Quant à l'origine des gènes de résistance aux antibiotiques, il reste à confirmer le processus évolutif remontant à leur origine (Kholodii 2003). Des gènes de résistance au chloramphénicol trouvés chez *Acinetobacter* ont montré une homologie entre beaucoup de cassettes mais qui n'ont aucun motif commun entre elles.

13.7.5. Îlots génomiques de résistance

Par définition, les îlots de pathogénicité sont porteurs de gènes qui codent pour des propriétés de virulence prouvées ou suspectées. Ils ont été décrits dans de nombreuses espèces bactériennes Gram négatives, mais aussi dans certaines espèces bactériennes Gram positives. Les îlots de pathogénicité sont des fragments linéaires d'ADN double-brin d'une taille variant entre 10 et 200 kilobases qui sont intégrés dans le chromosome bactérien ou, plus rarement, sur un plasmide de grande taille. Ils sont insérés à hauteur de sites spécifiques d'intégration (ou «hot-spots of integration»), fréquemment situés à hauteur des régions qui codent pour des ARN de transfert. Ils peuvent être perdus par délétion «en bloc». Ils constituent de véritables vecteurs naturels de clonage et d'expression des gènes de résistance. Des études ont montré la présence des PAI SRL (Pathogenicity island on *Shigella* resistance locus (SRL) chez de nombreuses souches de *Shigella*, et suggèrent que les PAI SRL peuvent être impliqués dans la propagation de la résistance multiple aux antibiotiques chez *Shigella* (Turner 2004). Les PAI sont censés être acquis par un transfert horizontal de gènes.

Chapître II: Travail Expérimental

I. Présentation détaillée du travail de thèse

Le microbiote intestinal, autrefois appelé microflore intestinale, est l'ensemble des bactéries qui vivent dans le tube digestif. Chaque individu héberge 10^{14} bactéries dans son intestin, ce qui représente 10 à 100 fois le nombre de cellules du corps humain (Eckburg 2005). Plus de 70% des bactéries du microbiote ne sont pas cultivables par les méthodes classiques. Grâce à l'avènement de la taxonomie moléculaire et plus récemment grâce à une nouvelle approche appelée métagénomique (séquençage de la totalité des génomes bactériens d'un microbiote), il est donc possible d'étudier le microbiote dans sa globalité, d'en décrire la grande diversité et de classer les bactéries sans passer par les méthodes de culture. Tout récemment, une méthode de spectrométrie de masse appelée MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) est utilisée pour détecter les bactéries à travers leur contenu protéique (Seng 2010). La composition en bactéries détermine le fonctionnement du microbiote intestinal. Les diarrhées constituent une des pathologies associées au microbiote digestif. Le but de ce travail était de connaître le répertoire des bactéries responsables de diarrhées et de détecter les pathogènes émergents ou réémergents.

Malgré des progrès importants dans la compréhension de leur pathogenèse et de leur prise en charge, les maladies diarrhéiques restent une des principales causes de la morbidité et de la mortalité infantile mondiale. Selon l'Organisation mondiale de la santé, au niveau mondial, les maladies diarrhéiques sont la deuxième cause de décès chez les enfants de moins de cinq ans, et est responsable de la mort de 1,5 millions d'enfants chaque année (OMS 2013). À l'heure actuelle, le risque de contracter des maladies diarrhéiques est multiplié par 5 en Afrique subsaharienne par rapport aux pays développés. Par ailleurs, en Afrique subsaharienne, et en particulier au Sénégal, la migration vers les villes a augmenté au cours des 30 dernières années, résultant en un paysage urbain désorganisé, où la population vit dans des conditions sanitaires insuffisantes, de pauvreté, ce qui a augmenté le risque de maladies infectieuses, y compris les maladies diarrhéiques et les infections respiratoires. Au cours des vingt dernières années, la plupart des études menées en Afrique subsaharienne, ont été principalement réalisées chez les enfants de moins de 5 ans et en milieu rural. Même si les adultes sont moins susceptibles d'avoir la diarrhée, et quand elle se produit, il est peu probable que la vie soit en danger, néanmoins elle contribue à la transmission de pathogènes entériques aux sujets vulnérables (enfants, personnes âgées et immunodéprimés). Par conséquent, il faut noter que peu de données sont disponibles concernant la prévalence et les étiologies des maladies diarrhéiques au sein de la population sénégalaise. Des études ont été menées à Dakar dans deux grands hôpitaux dans le but d'identifier les étiologies des diarrhées infectieuses

Chapitre II. Travail expérimental

(Gassama 2001). Les causes de la diarrhée aiguë comprennent un large éventail de virus, bactéries et parasites. Les caractéristiques et les motifs de l'isolement des agents étiologiques peuvent également varier d'un endroit à l'autre en fonction des conditions du climat, de la nourriture et de l'eau, de l'hygiène, de l'assainissement, la géographie et les éléments socio-économiques.

Dans l'étiologie des agents responsables des diarrhées au Sénégal, les Salmonelles arrivent largement en tête (selon les données du CNSE, 2002). *Salmonella* Typhi et Paratyphi bien que typiquement humaine n'entraînent pas de diarrhée. Les autres salmonelles appelées salmonelles mineures sont à l'origine des diarrhées ou toxi-infections alimentaires et peuvent provenir soit de l'alimentation soit de l'eau de boisson malsaine. Les Shigelles arrivent en deuxième position et sont suivies par *Escherichia coli*. Dans le genre *Shigella*, l'espèce *flexneri* est la plus isolée au Sénégal (Sambe-Ba 2013). Dans le traitement des diarrhées aiguës, la réhydratation est recommandée en première ligne associée à une antibiothérapie. Les antibiotiques généralement utilisés en Afrique sont l'ampicilline, le cotrimoxazole, et parfois la tétracycline (doxycycline). En raison de l'échec thérapeutique observé pour l'utilisation de ces antibiotiques, les céphalosporines et les quinolones sont devenues les molécules les plus prescrites. L'utilisation anarchique et abusive des antibiotiques dans la chimiothérapie, l'automédication mais aussi leur utilisation comme supplément dans l'alimentation du bétail exercent une pression de sélection de bactéries résistantes (Gassama-Sow 2010). La résistance bactérienne peut se transmettre soit horizontalement soit verticalement entre bactéries au moyen de gènes.

Les gènes de résistance aux antibiotiques sont généralement portés soit par des transposons, soit par des plasmides ou par les intégrons. Les classes d'intégrons 1 et 2 sont les plus retrouvées chez les souches entéropathogènes avec une multitude de combinaisons de cassettes d'intégrons. En Afrique de l'ouest, peu de travaux sont disponibles sur la contribution des intégrons à la résistance aux antibiotique (Gassama-Sow 2006). En plus des intégrons, un élément transposable et conjugatif déterminant de la résistance à la triméthoprime, à la streptomycine et au cotrimoxazole appelé SXT, peut être retrouvé aussi bien chez *Vibrio cholerae* (Ismail 2013) que chez les autres entérobactéries.

Les objectifs de notre étude étaient de déterminer les étiologies des diarrhées, de rechercher et de caractériser les intégrons et les gènes de résistance aux antibiotiques mais également de rechercher les gènes de virulence. Etudier par d'autres techniques la composition du microbiote digestif sénégalais dans le but d'identifier les pathogènes entériques classiques et ceux non répertoriés.

1. Aspects éthiques

Le protocole d'étude a été approuvé et validé par le Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé (CNEERS) du ministère de la Santé du Sénégal sous le numéro SEN25/07. Un consentement éclairé écrit était obtenu si le patient ou le parent de l'enfant, acceptait de participer à l'étude.

2. Population d'étude

La population d'étude était répartie en deux groupes :

- Un groupe cas, constitué de sujets diarrhéiques

Des échantillons de selles sont collectés chez des patients diarrhéiques (enfants et adultes) hospitalisés ou consultant à titre externe dans sept structures de santé de Dakar, sélectionnées.

- Un groupe constitué de sujets non diarrhéiques (groupe témoin)

Des échantillons de selles sont collectés chez des patients non diarrhéiques (enfants et adultes) hospitalisés ou consultant à titre externe dans sept structures de santé de Dakar sélectionnés pour une pathologie indépendante des infections entériques.

3. Critères d'inclusion

Des patients de tout âge étaient inclus dans l'étude avec le consentement éclairé signé par le malade ou par son accompagnant ou par le parent de l'enfant malade. Les patients devraient présenter une diarrhée définie par l'émission quotidienne d'au moins trois selles et/ou un volume supérieur à 300 ml/24heures.

4. Critères d'exclusion

Incapacité du patient à participer à l'étude, telle que jugée par le clinicien.

Etude 1: Analyse du microbiote digestif sénégalais

Au Sénégal, l'identification bactérienne est basée principalement sur des tests phénotypiques, à savoir la coloration de Gram, la culture, les caractéristiques de croissance et le profil biochimique. Même si les procédés de culture sont disponibles dans certaines structures de santé, l'identification des bactéries par des méthodes biochimiques reste limitée. En effet, ces méthodes traditionnelles nécessitent la possession d'un lot de bandelettes API (API-20E, API-20NE, Staph, anaérobies, etc) en fonction du type de bactéries ainsi que d'un lot de réactifs spécifiques qui doivent être stockés dans des conditions spécifiques. Enfin, les méthodes biochimiques sont longues et chères. Il y a cinq ans, on a observé une révolution en bactériologie avec l'apparition de l'identification systématique des bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Actuellement, cette technique permet l'identification précise des bactéries, de micro-organisme. Son utilisation est largement répandue dans de nombreux laboratoires cliniques en Europe. Cette méthode permet la détection de bactéries en moins d'1 heure et elle est également rentable. Ainsi, cette technique est devenue un outil puissant pour la routine et peut actuellement remplacer la coloration de Gram et l'identification biochimique mais jusqu'à maintenant, la plupart des études ont été réalisées en Europe. Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité d'appliquer la spectrométrie de masse MALDI-TOF sur les espèces bactériennes isolées de selles de patients sénégalais avec et sans diarrhée.

II. Patients, Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Prélèvements de selles

L'étude a porté sur des prélèvements de selles diarrhéiques et de selles de patients venus en consultation dans les mêmes centres pour une pathologie autre que la diarrhée.

Des échantillons de selles ont été collectés dans sept structures sanitaires (l'Institut d'Hygiène Sociale et le centre de santé Gaspard Camara) et de sa banlieue (les centres de santé Roi Baudouin de Guédiawaye, Baye Talla Diop (ex Dominique), Parcelles Assainies, Sicap-Mbao, et l'Institut de Pédiatrie Sociale de Pikine) et dans les hôpitaux de régions (Thiès et Diourbel-Touba).

L'échantillonnage de selles diarrhéiques s'est fait en trois périodes :

- première période de Mars à Avril 2009 : 25 échantillons de selles prélevés.
- deuxième période allant de Juillet 2009 à fin Janvier 2010 : 134 échantillons prélevés.
- Juillet 2010 à fin Novembre 2010 : 142 échantillons.

Les prélèvements de selles recueillis ont fait l'objet d'étude à Marseille dans le but de connaître la composition du microbiote digestif sénégalais. Les selles recueillies et congelées dans les tubes nunc ont été transportées à l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) à Marseille pour détecter des bactéries par la méthode de spectrométrie de masse appelée MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- Time Of Flight). C'est une technique nouvelle, rapide et fiable et permettant une bonne identification bactérienne sans passer par les méthodes bactériologiques classiques.

1.2. Données épidémiologiques

Des renseignements épidémiologiques sur le patient sont notés sur un questionnaire. Il s'agit du nom du patient, du sexe, de l'âge, du contact avec des animaux domestiques, des données géographiques à savoir sa résidence (voir annexe 1).

1.3. Données cliniques

Lorsqu'un patient est inclus dans l'étude, un dossier clinique standardisé (voir annexe 1) est rempli, sur lequel est inscrit un numéro d'identification du patient. Un bilan clinique de base est réalisé. Les patients adultes font en plus l'objet d'un interrogatoire à la recherche d'antécédents de signes digestifs (diarrhées, vomissements....) ou d'antécédents de prise de médicaments (anti-diarrhéiques, antibactériens). Un examen anthropométrique est réalisé (poids, taille, ect...). Un échantillon de selles est prélevé dans un pot stérile pour chaque patient portant un numéro d'identification; il est accompagné du dossier clinique et envoyé à l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur.

Des échantillons de selles ont été collectés chez des patients diarrhéiques (enfants et adultes), hospitalisés ou consultant à titre externe dans les structures de santé de la ville de Dakar. Le recrutement des sujets non diarrhéiques est réalisé parmi les personnes hospitalisées ou consultants à titre externe pour une pathologie indépendante des infections entériques.

Les patients ont été recrutés dans des services de consultations externes de huit grands centres de santé, situé dans les trois villes. Les patients qui répondaient aux critères de sélection: diarrhée (trois selles ou plus molles ou liquides sous 24h survenant dans le mois précédant la visite) et aucun traitement anti-infectieux, une semaine avant la date de la visite ont été invités à participer. Après consentement éclairé a été donné le patient a été évaluée cliniquement par un médecin et de l'information médicale a été obtenu à partir du patient ou le parent de l'enfant. Les données cliniques, démographiques et épidémiologiques comprenaient l'âge, le

Chapître II. Travail expérimental

sexe, le lieu de résidence, le poids et la taille, des symptômes tels que la fièvre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, de l'état de déshydratation (selon la turgescence cutanée et le remplissage capillaire), nombre de selles liquides pendant le 24h passé, et si le patient a eu recours aux antibiotiques, antiparasitaires, antipyrétiques ou la médecine analgésique. Pour chaque patient, un échantillon de selles ont été recueillis dans un récipient en plastique stérile et immédiatement transporté au laboratoire de Bactériologie de l'Institut Pasteur de Dakar.

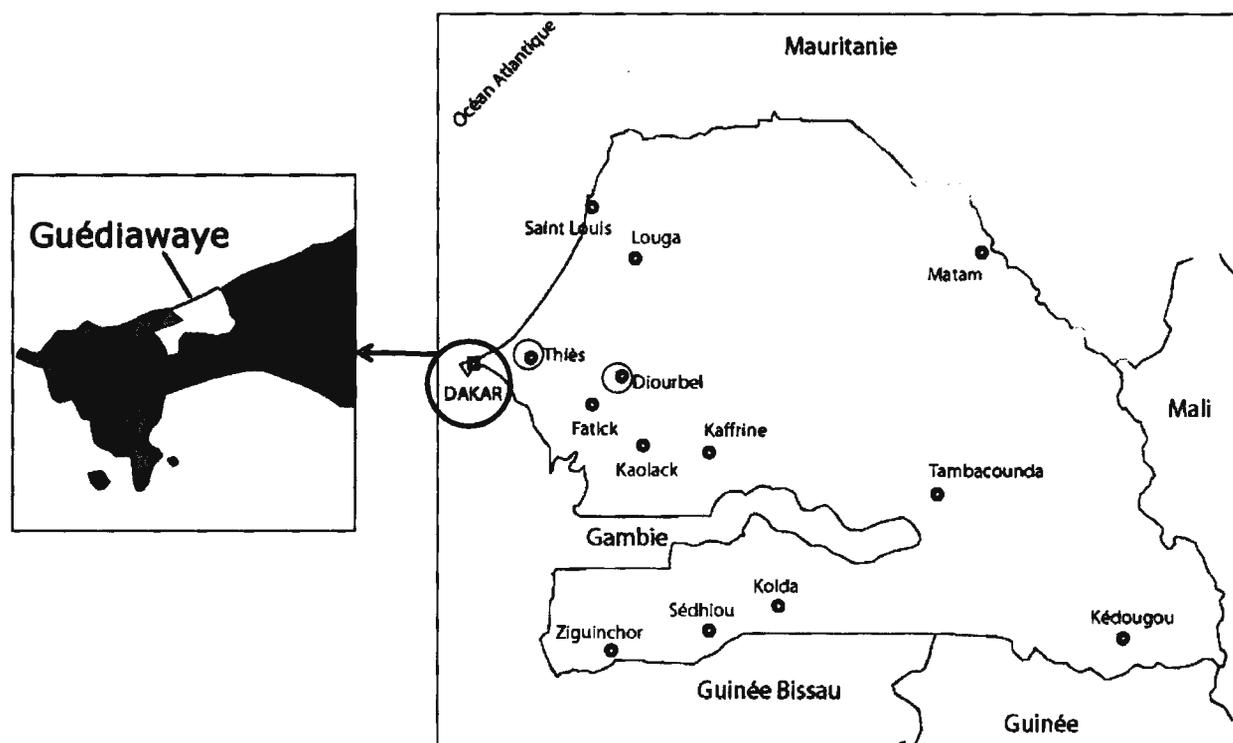


Figure 21 : Représentation sur la carte des sites d'étude (régions)

1.4. Autres matériels (voir en annexe)

2. Méthodes

Les échantillons de selles collectés ont été mis dans des tubes nunc (Fisher Scientific thermique Danemark) stériles ou dans du milieu Carry Blair pour les selles provenant des hôpitaux des régions et transportés à Timone hôpital, URMITE Marseille).

2.1. Milieux de culture

Des milieux de culture divers ont été utilisés et à des conditions différentes. Le BCP (Bromocresol Pourpre), Mac Conkey, la gélose Columbia + 5% de sang de mouton, le BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract), le LAMVAB (Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green) ont été utilisés (voir tableau I).

Tableau I : Différents milieux de culture utilisés

Milieux	Conditions de culture	Fournisseurs
Innoculation directe		
Gélose Columbia, 5% sang de mouton	Aérobie, 37°C, 48 heures	Biomérieux, Marcy l'étoile, France
Columbia, 5% sang de mouton	Anaérobie, 37°C, 48 heures	Biomérieux
Gélose Mac Conkey	Aérobie, 37°C, 48 heures	Biomérieux
Gélose BCYE	Aérobie avec 2.5% CO ₂ , 37°C, 5 jours	Biomérieux
Gélose BCP	Aérobie, 37°C, 48 heures	Biomérieux
Gélose LAMVAB	Anaérobie, 37°C	Faite maison

Innoculation dans flacon d'hémoculture 24 h, puis ensemencement dans

Columbia, 5% sang de mouton	Aérobie, 37°C, 3 jours	Biomérieux
Mac Conkey	Aérobie, 37°C, 1 jour	Biomérieux
Columbia, 5% sang de mouton	Anaérobie, 37°C, 3 jours	Biomérieux

BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract, BCP: Bromocresol Purple

LAMVAB: Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green.

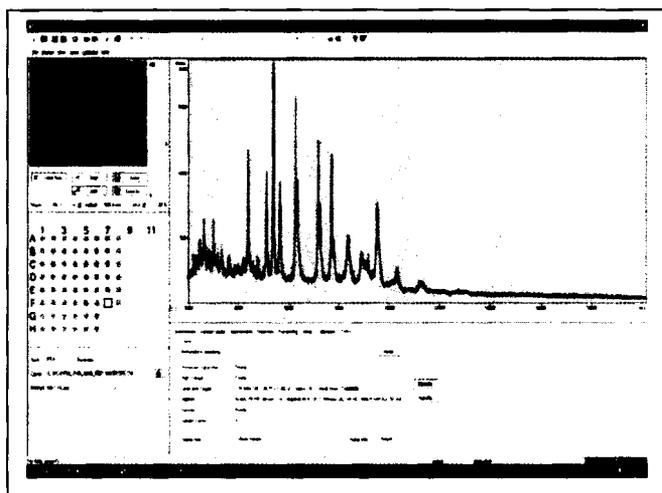
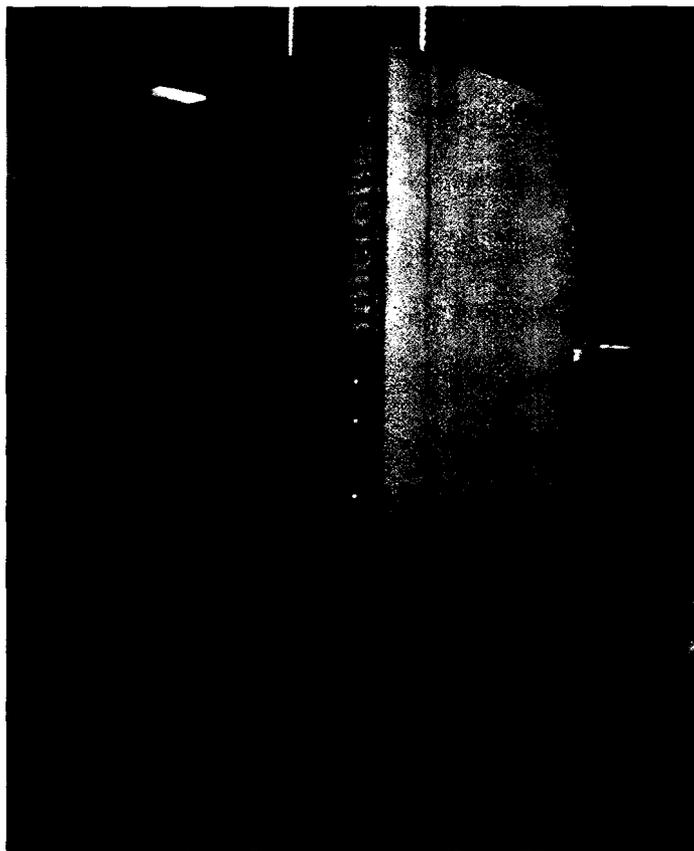
2.2. Méthodes de culture

Pour énumérer le nombre d'unité formant colonies (UFC), 1g de selles pâteuses a été dilué dans 9ml de PBS (phosphate buffered saline) ou 1ml de selles liquides dans 9ml de PBS.

Chapître II. Travail expérimental

L'échantillon dilué a été introduit à l'aide d'une seringue dans des flacons d'hémoculture aérobie et anaérobie et incubés pendant 24h ou plus avant d'être réensemencés sur des milieux gélosés. Les boîtes de gélose pour la culture d'anaérobies ont été d'abord mises dans des jarres en anaérobiose. L'utilisation des flacons d'hémocultures est de faciliter la croissance des bactéries dont les selles étaient conservées à -20C. Les selles ont été diluées de 10^{-1} à 10^{-10} et inoculées sur des milieux gélosés et soumis à des conditions de température variées. Différentes conditions physiques et chimiques ont été appliquées (température, pH, atmosphère). L'incubation en microaérophilie ou en anaérobiose a été faite en utilisant des genbags microaérophile (Oxoid, Baingstoke, Angleterre), des jarres (Mitsubishi) et des générateurs d'anaérobiose (BD Diagnostics, Heidelberg, Allemagne).

2.3. Le spectromètre de masse MALDI-TOF



Spectre

Result Overview					
Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
SC08371_1 (+)(B)	A5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.83	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.75
SC08371_1 (+)(B)	A10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.76	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.75
SC08371_2 (++)(B)	B18	<i>Dendrobates sp.</i>		<i>Dendrobates imitator</i>	
SC08371_2 (++)(A)	E8	<i>Dendrobates sp.</i>		<i>Dendrobates tinctorius</i>	
SC02971 (+)(A)	C5	<i>Prochloron aeruginosus</i>		<i>Prochloron aeruginosus</i>	1.84
SC02971 (++)(A)	CD	<i>Prochloron aeruginosus</i>		<i>Prochloron aeruginosus</i>	
SC02969 (-)(C)	D10	<i>Yersinia burginiae</i>		<i>Chitinibius chitinus</i>	
SC02969 (-)(C)	D8	<i>Adiantum pigmentum</i>		<i>Larobolus parvulus</i>	

Identification

Figure 22 : Appareil MALDI-TOF type Microflex (Bruker)

Chaque gélose était observée après 48h ou 7 jours d'incubation. Toute colonie bien isolée était prélevée et déposée sur deux spots de la cible Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonik, Wissembourg, France) et recouverte de 2 ml de solution de matrice (solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans 50% d'acétonitrile et d'acide trifluoroacétique 2,5%). La préparation était séchée à l'air libre à température ambiante pendant 5 minutes. Toute colonie déposée a été aussi mise dans un tube eppendorf contenant du bouillon Tryptocaséine-Soja et stocké dans l'étude à 37C. Pour les colonies de bactéries anaérobies, un bouillon de thioglycolate (BD Diagnostics) était utilisé. Le spectromètre de masse MALDI-TOF analyse le contenu protéique de la colonie bactérienne sous forme de spectres. Le logiciel Biotyper compare le profil protéique de la colonie obtenu avec les profils de bactéries déjà constitués dans une base de données (base de Bruker et celle de l'hôpital Timone régulièrement mise à jour à partir des résultats du diagnostic clinique. Ce logiciel prend en compte un maximum de 100 pics et de masse comprise entre 3000 et 15000 Da (Daltons). Le résultat apparaît sur l'écran sous un nom de bactérie. Un score > 1,9 indique une bonne identification du genre et de l'espèce. Un score >1,7 indique une identification du genre seulement et un score inférieur à 1,7 montre qu'il n'y a aucune identification bactérienne. Après deux tentatives de dépôts, s'il n'y a pas d'identification par MALDI-TOF, les colonies sont analysées par séquençage en ciblant l'ARN 16S.

2.4. Séquençage de l'ARN 16S

L'ADN bactérien est d'abord extrait en utilisant le kit MagNa Pure LC ADN (Roche, France) avec l'instrument MagNa Pure LC. Le produit extrait est amplifié par PCR en utilisant la paire d'amorce *fdl* et *rp2* à une température d'hybridation de 52C. Le produit PCR est purifié en utilisant le kit de purification (PCR Nucleofast 96 Macherey-Nagel). Les réactions de séquençage ont été réalisées grâce au kit de séquençage Big Dye Terminator, version 1.1 (Perkin-Elmer) avec des amorces *536f*, *536r*, *800f*, *800r*, *1050f* et *1050r* (voir tableau II). Les produits de séquençage ont été purifiés et les séquences analysées sur l'appareil ABI Prism Genetic Analyzer 3130X (Applied Biosystems, Californie, USA). Les séquences obtenues ont été comparées avec la base de données GenBank en utilisant le logiciel BLAST. Une valeur seuil de similarité > 98,5% était indiquée pour l'identification des espèces. En dessous de cette valeur, la réaction de séquence était reprise. Une nouvelle espèce était suspectée lorsque la similitude dans la base de données GenBank avec une bactérie était < 98,5%.

Chapître II. Travail expérimental

Tableau II : Amorces utilisées pour la PCR 16S rRNA et le séquençage

Amorces	Séquences (5' - 3')	Temperature d'hybridation
<i>FD1</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	52°C
<i>RP2</i>	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	52°C
<i>536F</i>	CAGCAGCCGCGGTAATAC	50°C
<i>536R</i>	GTATTACCGCGGCTGCTG	50°C
<i>800F</i>	ATTAGATACCCTGGTAG	50°C
<i>800R</i>	CTACCAGGGTATCTAAT	50°C
<i>1050F</i>	TGTCGTCAGCTCGTG	50°C
<i>1050R</i>	CACGAGCTGACGACA	50°C

**Etude 2: Etude étiologique des diarrhées infectieuses
et caractérisation des pathogènes entériques**

Chapitre II. Travail expérimental

Au Sénégal, les diarrhées sont responsables d'un fort taux de morbidité et mortalité, particulièrement chez les enfants de moins de cinq ans. Les étiologies peuvent être virales et parasitaires, mais elles sont principalement bactériennes. Dans ce dernier cas, l'antibiothérapie constitue le traitement de choix; elle permet de réduire la sévérité de la maladie, cependant, leur utilisation intensive et irrationnelle a conduit à une forte pression de sélection, facteur qui a favorisé l'émergence et la dissémination de souches multirésistantes. Des études ont été menées à Dakar dans le but d'identifier les étiologies des diarrhées infectieuses, mais elles n'ont concerné que deux centres hospitaliers. Dans notre étude, nous nous proposons d'étudier les étiologies des diarrhées infectieuses dans des structures de santé de Dakar et de sa banlieue et de deux hôpitaux de régions du Sénégal.

III. Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Prélèvements de selles

L'étude a porté sur des prélèvements de selles diarrhéiques et de selles de patients venus en consultation dans les mêmes centres pour une pathologie autre que la diarrhée.

Des échantillons de selles ont été collectés dans sept structures sanitaires (l'Institut d'Hygiène Sociale et le centre de santé Gaspard Camara) et de sa banlieue (les centres de santé Roi Baudouin de Guédiawaye, Baye Talla Diop (ex Dominique), Parcelles Assainies, Sicap-Mbao, et l'Institut de Pédiatrie Sociale de Pikine) et dans les hôpitaux de régions (Thiès et Diourbel-Touba).

L'étude a porté sur des prélèvements de selles diarrhéiques et de selles de patients venus en consultation dans les mêmes centres d'étude pour une pathologie autre que la diarrhée. Les prélèvements de selles de patients participant dans l'étude ont été mis dans des deux tubes nuncs pour chaque échantillon et congelés.

1.2. Autres matériels (voir en annexe)

2. Méthodes

Les analyses ont été effectuées à l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar.

Examen parasitologique, virologique et bactériologique des selles

L'examen parasitologique et virologique se faisait au premier jour, alors que l'examen bactériologique des selles se déroulait sur quatre jours au maximum. Le travail a été réalisé à l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar et commençait par la numérotation des pots de selles. Pour chaque prélèvement, un numéro de travail a été attribué.

2.1. Examen parasitologique des selles

2.1.1. Examen macroscopique

Sur les selles fraîches un examen macroscopique était fait permettant de noter l'aspect des selles : molles, pâteuses, liquides, glaireuses, sanglantes, en « eau de riz », afécales. Il permettait aussi de voir des parasites adultes visibles à l'œil nu.

2.1.2. Examen microscopique

Il s'agit d'examens à l'Etat Frais et après coloration.

Un Etat Frais est réalisé : une fraction de selle est diluée dans l'eau distillée sur lame et recouverte d'une lamelle. La préparation est observée au microscope optique au grossissement (X40). L'Etat Frais permet de mettre en évidence les kystes et les formes végétatives de protozoaires.

Techniques de coloration: plusieurs techniques de coloration peuvent être réalisées sur les selles.

- technique au Merthiolate-Iode-Formol : il s'agit d'une coloration permettant l'enrichissement et l'identification des oeufs d'helminthes et de protozoaires.
- technique de Kinyoum permettant la recherche de coccidies
- technique au Trichome Weber permettant la recherche de microsporidies.

2.2. Examen virologique

La recherche des virus entéropathogènes (Rotavirus et Adenovirus) était faite avec le kit Vikia Adeno-Rotavirus (BioMérieux France) sur les selles fraîches. Le protocole suivant était suivi :

- Distribuer 50 µl de selle dans le flacon contenant le tampon de dilution.
- Vortexer jusqu'à homogénéisation.
- Retirer la cassette du sachet scellé et l'utiliser rapidement.
- Transférer deux gouttes de selle diluée dans le puits échantillon (S) de la cassette.

- Lecture des résultats après 8 à 10mn d'imprégnation dans la cassette.
 - Si une ligne de contrôle « C » et une ligne rouge en « A » apparaissent, l'échantillon est positif pour les Adénovirus.
 - Si une ligne de contrôle « C » et une ligne bleue en « R » apparaissent, l'échantillon est positif pour les Rotavirus.
 - Si une ligne de contrôle « C », une ligne rouge en « A » et une ligne bleue en « R » apparaissent, l'échantillon est positif à la fois pour les Adenovirus et les Rotavirus.
 - Si une ligne de contrôle « C » apparaît seul, l'échantillon est négatif.
 - Si la ligne de contrôle « C » n'apparaît pas, le test est ininterprétable.
- La détection de Calicivirus et Enterovirus était faite à l'aide de la microscopie électronique.

2.3. Examen bactériologique

L'examen bactériologique des selles était réalisé en quatre jours au maximum et comprenait les étapes suivantes.

2.3.1. Examen macroscopique

Premier jour :

Les selles collectées ont été observées à l'œil nu pour la description de leur aspect. L'aspect des selles est évocateur. Le mucus ou la glaire présents dans les selles étaient plus susceptibles de contenir les germes recherchés.

La présence de leucocytes, d'hématies, de germes à mobilité caractéristique (*Vibrio cholerae*, *Campylobacter*), de formes parasitaires et de levures filamenteuses dans les selles était aussi rapportée sur la feuille de paillasse.

2.3.2. Examen microscopique

Etat frais : une fraction de selle a été diluée dans de l'eau distillée sur lame et recouverte d'une lamelle. La préparation est observée au microscope optique, elle permet d'apprécier l'état de la flore (pauvre, peu abondante, abondante ou très abondante) et de la mobilité des germes qui la composent ; elle permet également de rechercher la présence d'œufs de parasites, de leucocytes et d'hématies;

La coloration de Gram permettait d'évaluer la composition de la flore intestinale du patient. Elle peut être équilibrée ou déséquilibrée. Des échantillons de selles ont été également conservés de deux façons différentes pour des examens ultérieurs.

- Deux millilitres d'éthanol absolu ont été ajoutés à un volume de selles et stocké dans un tube à hémolyse pour une conservation à la température ambiante.
- Une quantité de selle a été conservée dans deux tubes Nunc de 1,5 ml contenant du glycérol et gardés au congélateur à -20°C.

2.3.3. Coproculture

La coproculture est la culture bactériologique de selles pour déceler la présence de bactéries pathogènes normalement absents du tube digestif. Elle est mise en œuvre pour l'identification des bactéries classiques pathogènes. Les selles sont diluées et ensemencées sur des milieux gélosés et l'incubation est faite pendant 18h à 24h à 37°C en atmosphère normale pour Hektoen, BCP. Lorsque les selles étaient liquides, en « eau de riz », elles étaient ensemencées sur TCBS (thiosulfate – citrate – bile – saccharose) et enrichis sur EPA pour rechercher *Vibrio*. On procédait ensuite à un enrichissement des selles en utilisant le bouillon Muëller-Kauffman ou bien le bouillon Rappaport-Vassiliadis-Soja pour favoriser la croissance des salmonelles pendant 4h à 37°C sous agitation. Le bouillon était repiqué sur Hektoen ou Rambach pour isoler *Salmonella* et *Shigella*.

Pour la recherche de *Campylobacter*, les selles étaient mises en suspension dans un bouillon Preston et était incubé sous atmosphère microaéroophile. Après 24h d'incubation, le bouillon Preston était repiqué sur Karmali incubé à l'étuve 42°C en microaérophilie pendant 24h.

Deuxième jour:

On procédait à la lecture de boîtes pour identifier les différentes colonies suspectes. En cas de présence de colonies suspectes sur Hektoen et BCP, nous procédons comme suit:

- Test à l'uréase : Ensemencement de 3-5 colonies suspectes dans un tube à hémolyse contenant 1,5 ml d'urée.
- Incubation de tous les tubes à l'étuve pendant environ 4 heures à 37°C

Si les colonies ne possédaient pas d'uréase:

-Identification par des tests biochimiques (voir en annexe):

ensemencer une mini-galerie, incubée à 37°C, 18-24h : ensemencement constitué des milieux suivants:

- Gélose ordinaire (GO).
- Kligler-Hajna (KH)
- Mannitol-Mobilité (MM)

Le reste de la galerie était ensemencé en cas de suspicion de salmonelles/shigelles ou vibrions

Pour les colonies à urée positive : on poursuivait l'identification seulement si on avait une culture pure.

Troisième jour:

Lecture de la mini galerie et identification; si la galerie présentait les caractères d'une bactérie entérique, à partir de la gélose ordinaire, une galerie API20E (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) et un antibiogramme étaient réalisés.

La galerie API20E

La galerie API20E est une galerie miniaturisée qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques par des réactions enzymatiques. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous formes déshydratés; les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les résultats produits pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Après ajout des réactifs de révélation, le profil numérique de la souche est établi et comparé au catalogue analytique API20E de Biomérieux (réf. 20190).

2.3.4. Antibiogramme

L'antibiogramme était effectué par la méthode de diffusion sur milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (Cavallo 2010). Le protocole suivant était utilisé :

- Suspension bactérienne à 0,5 MF.
- Ensemencement des géloses Mueller-Hinton par écouvillonnage

Mise en place des disques d'antibiotiques (voir en annexe 3) sur des boîtes carrées de 120 mm de côté à l'aide d'un distributeur automatique de disques.

- Incubation en atmosphère normale à 37°C pendant 24h.
- Identification des colonies suspectes sur Rambach et Hektoen.

Quatrième jour:

Lecture des boîtes de gélose Karmali.

Les colonies suspectes de *Campylobacter* étaient colorées au Gram et les tests oxydase et catalase réalisés.

Identification par API Campy (voir en annexe).

Lecture galerie API20E.

Interprétation des résultats de l'antibiogramme selon les diamètres des zones d'inhibition des disques était faite. Les bactéries étaient sensibles, intermédiaires ou résistantes selon les recommandations du CASFM.

2.3.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'un antibiotique donné capable d'interrompre, dans un milieu, toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée. Les géloses Mueller-Hinton (Becton Dickinson) étaient ensemencées à l'aide d'un écouvillon imbibé de la suspension bactérienne. Dès que la surface des géloses était sèche, une bandelette E-test® (Biomérieux France) y était déposée. Ensuite, les boîtes étaient incubées à l'étuve 37°C. Après 24h d'incubation, la CMI était lue directement à l'intersection du bord d'inhibition et la bandelette Etest®. Les antibiotiques testés étaient l'acide nalidixique et la ciprofloxacine.

2.3.6. Sérotypage

Le sérotypage était réalisé par agglutination sur lame d'une culture pure après identification biochimique. Toutes les salmonelles étaient sérotypées avec des antisérums polyvalents (Statens serum Institut 5, Artillerivej 2300 Cph.S Denmark) et monovalents. Le sérotypage était réalisé au niveau du CNSE.

Cinquième jour:

Lecture API Campy.

Les colonies bactériennes identifiées étaient conservées sur cryobilles à -80°C pour les études moléculaires.

2.4. Procédés moléculaires

2.4.1. Extraction d'ADN total

Il s'agit d'une extraction par la méthode de choc thermique ou thermolyse, réalisée de la façon suivante :

- A partir d'une culture pure et jeune d'une colonie de bactérie dans 1ml de milieu A milieu Caye (Voir composition en annexe 3).
- Après agitation, la culture est transvasée dans un tube eppendorf de 2ml puis
- Centrifugée à 6000 tours/mn en 5 minutes. Le surnageant est éliminé
- Le culot est lavé dans 500µl d'eau distillée et centrifugé à nouveau à 6000 tours/mn en 5 minutes. Le surnageant est alors éliminé

Chapitre II. Travail expérimental

- Un deuxième lavage du culot est effectué dans 500µl d'eau distillée et centrifuger à nouveau à 6000 tours/mn en 5 minutes. Le surnageant est éliminé
- Le culot est repris pour la dernière fois dans 500µl d'eau distillée puis agité légèrement au vortex
- La suspension bactérienne est chauffée à 100°C pendant 10 minutes (ne pas oublier de percer les tubes. Les bactéries éclatent et l'ADN est libéré.
- Laisser refroidir les tubes sur la paillasse puis centrifuger à 10000 tours/mn en 5 minutes.
- Récupérer dans un autre tube juste après la centrifugation 300µl du surnageant sans toucher le culot.
- Garder les tubes à -20°C jusqu'à utilisation.

2.4.2. Extraction d'ADN génomique

Il s'agit d'une extraction chimique utilisant un kit prêt à l'emploi (Qiamp DNA Mini Kit Cat. 51304 Qiagen). C'est une méthode rapide et fiable :

- Racler les colonies et les diluer dans 180µl de tampon ATL (tampon de lyse des tissus), vortexer
- Ajouter 20µl de protéinase K, vortexer, incuber à 56°C, pendant 1 heure
- Centrifuger brièvement (15 secondes).
- Ajouter 200µl de tampon AL (tampon de lyse), vortexer, incuber à 70°C, 10 minutes
- Centrifuger brièvement (quelques secondes)
- Ajouter 200µl d'éthanol absolu à froid (96-100°), vortexer
- Centrifuger brièvement (quelques secondes)
- Déposer le mélange (600µl, y compris le précipité) dans la colonne Qiagen, centrifuger 8000 tours/mn pendant 1 minute.
- Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube de collection
- Ouvrir la colonne doucement et ajouter 500µl de tampon AW1 (tampon de lavage) additionné d'éthanol, refermer la colonne et centrifuger à 8000 tours/mn, 1 minute
- Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube de collection.
- Ouvrir la colonne et ajouter 500µl de tampon AW2 (tampon de lavage) additionné d'éthanol, refermer la colonne et centrifuger à 14000 tours/mn, 3 minutes.
- Mettre la colonne dans un tube eppendorf de 1,5ml.
- Ajouter 200µl de tampon AE (ou élution avec eau distillée), incuber à température ambiante 1 minute, centrifuger à 8000 tours/mn, 1 minute.
- Jeter la colonne et conserver l'ADN à -20°C.

2.4.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

2.4.3.1. Définition

C'est l'abréviation en anglais de Polymerase Chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne) qui consiste en une amplification d'un fragment d'ADN de petite taille (1 million de fois) par action de la Taq polymérase, d'amorces spécifiques et de nucléotides dans un thermocycleur. C'est une technique mise au point en 1985 par Kary Mullis.

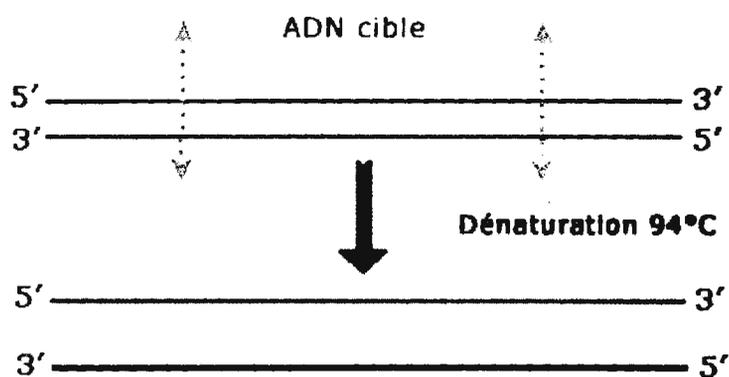
2.4.3.2. Principe

La première étape consiste en une dénaturation de l'ADN.

Au cours de la deuxième étape, la zone d'ADN à amplifier (ADN cible) est flanquée de deux amorces oligonucléotidiques (primers). Ces amorces vont s'hybrider de façon spécifique aux deux extrémités de la séquence cible d'ADN sur chacun des brins dénaturés à une température donnée dépendante de la nature des bases des amorces.

La troisième étape fait agir la taq polymérase dans des conditions appropriées, à 72°C en utilisant les dNTP.

L'ADN polymérase synthétise les brins supplémentaires à partir des amorces, ce qui permet de doubler l'ADN cible. Quelques cycles ainsi répétés aboutissent à la constitution d'un ADN cible multiplié exponentiellement, 2^n (n étant le nombre de cycles de la réaction).



L'utilisation de l'ADN d'un témoin positif permet de vérifier les bonnes conditions de préparation du mélange réactionnel et d'amplification. Les témoins négatifs permettent de vérifier les éventuelles contaminations.

L'amplification génique se fait dans un thermocycleur (2720 thermal Cycler Applied Biosystems).

2.4.3.4. Analyse du produit d'amplification

Les amplicons sont séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose. L'électrophorèse se faisait dans une cuve contenant du TBE 1X ou du TAE 20X, reliée à un générateur de courant. La migration était réalisée sous une tension de 100V pendant 45 minutes.

La lecture du gel se faisait par visualisation directe sous UV (dans une chambre noire) avec l'appareil photographique Polaroid ou sur l'appareil Genepath System.

La réalisation du gel d'agarose à 1% se faisait avec du tampon TBE 1X (1ml de la solution mère 10X et compléter à 100ml H₂O) ou TAE 20X (2ml de solution mère 50X et compléter à 100ml H₂O). Un gramme de poudre d'agarose est remis en suspension dans 100ml de TBE 1X dans un bêcher, puis chauffé jusqu'à dissolution complète. La solution ainsi obtenue est refroidie à température ambiante avant d'en rajouter 1 à 2 gouttes de bromure d'éthidium (0,5µg/ml) puis coulée dans un bac contenant des peignes. Ces derniers servent à mouler les puits de dépôts des échantillons de migration.

- Déposer dans les puits 8µl de la réaction PCR mélangés avec 2µl de bleu de bromophénol.
- Déposer aussi 8µl de marqueur de poids moléculaire 100pb (Bioline) dans le premier puits.

2.4.4. Recherche des gènes de résistance

A partir des différents phénotypes observés, des gènes de résistance ont été recherchés. Ce sont les gènes *bla_{oxa}*, *bla_{tem}*, *bla_{shv}*, *bla_{CTXM}*, *bla_{kpc}*, *bla_{vim}* et *bla_{imp}* codant respectivement la résistance aux aminopénicillines, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Le gène *cat*, codant la résistance au chloramphénicol, les gènes *tet* codant la résistance aux tétracyclines, le gène *dfr* codant la résistance au triméthoprime, le gène *aadA1* codant la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine, et le gène *sat* à la streptothricine ont été recherchés. Des gènes codant la résistance aux quinolones ont été aussi recherchés. Il s'agit de gènes de structure: *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* et des gènes plasmidiques: *qnr* et *qepA*.

2.4.5. Détection des intégrons

La détection des intégrons a été réalisée par la technique d'amplification génique avec des amorces spécifiques pour chaque classe d'intégron (Voir tableau en annexe).

Les amorces sont utilisées à une concentration de la solution mère de 100ng/μl.

-Détection des intégrons de classe 1

Nous avons réalisé la PCR avec les amorces 36869/37246

La taille attendue est de 580 paires de bases (pb).

-Détection de la région 3' des intégrons de classe 1

Les amorces utilisées sont orf4/sul1 et orf6/sul3.

Détection de la région variable des intégrons de classe 1

Amorces utilisés : 36854/36855 et 36854/36856

- Détection des intégrons de classe 2

PCR Int2F/Int2R

La taille attendue est 806 pb.

- Détection de la région variable des intégrons de classe 2

Différentes PCR ont été réalisées

PCR int2S/Sat1 : taille attendue 1100pb

PCR int2S/aadA2 : taille attendue 1700-1800pb

PCR Orfx3/Sat1 : taille attendue >1800pb

- Détection de la région 3' des intégrons de classe 2

Amorces utilisées IntCS2/Int7s.

- Détection des intégrons de classe 3

Amorces Int3F/Int3R. La taille attendue est 1200pb.

2.4.6. Caractérisation des intégrons

2.4.6.1. Caractérisation des intégrons de classe 1

La caractérisation des intégrons de classe 1 a été réalisée par amplification génique de la région variable constituant la région des cassettes. Le produit PCR ainsi obtenu est purifié avant d'effectuer la réaction de séquençage.

2.4.6.2. Caractérisation des intégrons de classe 2

La caractérisation des intégrons de classe 2 a été faite essentiellement par amplification génique de la région variable de l'intégron, ce qui a permis d'identifier les différentes cassettes. Elle n'est valable que lorsqu'il n'apparaît qu'une seule bande sur le gel d'agarose; s'ils apparaissent plusieurs bandes, la nécessité est de faire une extraction sur gel.

2.4.7. Recherche de facteurs de virulence

Elle se faisait par amplification génique pour *E. coli*. On recherchait les facteurs de virulence *eae*, *bfpA*, *ST*, *LT*, *ipaH*, *SLTI*, *SLTII*, *eagg* pour *E. coli* pathogènes.

2.4.8. Le clonage

2.4.8.1. Principe

Le clonage est un processus qui consiste à isoler un fragment d'ADN et à le multiplier identiquement en l'insérant dans une molécule d'ADN « porteuse » communément appelée vecteur permettant son amplification. Le vecteur de clonage courant est le plasmide bactérien. L'ADN du plasmide est coupé par une enzyme de restriction et lié in vitro au fragment d'ADN étranger coupé par la même enzyme de restriction ou une enzyme qui donne des extrémités compatibles.

Le clonage a été effectué sur les souches de *Salmonella* et sur la souche de *Shigella flexneri* résistantes à l'acide nalidixique dans le but d'avoir des bandes pures pour le séquençage.

2.4.8.2. Technique

Quatre phases sont requises dans le clonage bactérien:

La ligation

Elle a été faite grâce au kit Promega (PGEM-T Easy Vector System 2): dans le kit, les cellules compétentes se conservent à -80°C , les autres produits se conservent à -20°C

Mettre les tubes dans la glace et prendre :

Tampon ligase : $5\mu\text{l}$

PGEM : $1\mu\text{l}$

T4 ligase : $1\mu\text{l}$

Produit de PCR : (ex : $0,5\mu\text{l}$)

Eau qsp $10\mu\text{l}$: (ex : $2,5\mu\text{l}$)

Vortexer. Mettre dans un thermocycler une nuit à 15°C .

La transformation

Chapître II. Travail expérimental

Dès que les cellules sont décongelées :

- Distribuer 50µl de cellules au fond du tube en polypropylène
- Ajouter 7µl de produit de ligation délicatement sur les cellules au fond du tube (ne pas mettre sur les parois du tube). Remuer le tube délicatement.
- Laisser exactement 20min dans la glace
- Faire un choc thermique exactement 1min à 42°C puis 2min dans la glace
- Ajouter 950µl de LB liquide sans ampicilline. Agiter délicatement.
- Incuber 1h30mn à 37°C (expression des protéines de résistance). Agiter de temps en temps. Pendant ce temps, sortir 2 boites de milieu solide ampicilline et mettre à 37°C pour qu'elles soient à température.
- Après l'incubation : agiter légèrement, distribuer sur les boites, étaler avec un enseigneur râteau en plastique sur toute la surface.
- Incuber dans l'étuve à 37°C jusqu'au lendemain.

La culture

Si sur le fragment est inséré il y a des colonies blanches

Préparer :

- eppendorf
- tubes cornings de 15ml (ou 10 eppendorfs)
- 1 boite de milieu solide ampicilline préchauffé à 37°C
- 50ml de milieu liquide ampicilline dans des gros cornings (40µl ampicilline pour 40ml de milieu).

Distribuer 5ml de milieu dans chaque corning de 15ml (ou 1ml si eppendorfs).

Distribuer 25µl d'eau distillée stérile dans les ependorfs stériles.

A partir d'une colonie, à l'aide d'une pointe à l'extrémité d'une pipette :

- prélever toute la colonie
- touiller un peu dans l'eau (les bactéries sont lysées dans l'eau)
- touiller dans le milieu liquide
- déposer sur la boite de pétri
- Mettre les ensemencements en milieu liquide, sur agitateur, à 37°C jusqu'au lendemain.
- Mettre les boites à 37°C jusqu'au lendemain.
- Faire une PCR sur les échantillons en eppendorf.

2.4.9. Le séquençage

2.4.9.1. Principe

Le but est de déterminer la succession des bases que sont l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et la thymine (T) dans un génome (ADN). Cette succession est typique pour chaque génome et permet d'identifier les gènes.

L'ensemble est soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase peut, au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, incorporer un désoxynucléotide ou un didésoxynucléotide. Dans le cas où elle incorpore un désoxynucléotide, la synthèse peut continuer, dans le cas contraire elle s'arrête. Ce choix étant aléatoire, chaque base de l'ADN matrice aura statistiquement vu un certain nombre de fois l'incorporation d'un didésoxynucléotide, si bien que le milieu réactionnel contient l'ensemble des molécules néosynthétisées possibles.

Le séquenceur automatique détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation est faite en terme de nucléotides. Sur la courbe, un pic correspond à la détection d'un nucléotide donné dans la séquence.

2.4.9.2. Technique

- Purification du produit de PCR ou du produit de clonage

C'est une méthode chimique utilisant un kit prêt à l'emploi. Elle consiste à enlever tous les autres constituants de sorte que l'ADN à séquencer soit pur.

- Ajouter 5 volumes de tampon PB (Tampon de liaison) pour 1 volume de produit PCR
- Placer une colonne dans un tube de collection
- Déposer l'échantillon dans la colonne et centrifuger 1mn à 13200tours/mn
- Eliminer le contenu du tube de collection
- Replacer la colonne dans le même tube
- Ouvrir la colonne et déposer 750µl de tampon PE (tampon de lavage), centrifuger 1mn à 13200tours/mn
- Placer la colonne dans un nouveau tube eppendorf
- Ouvrir la colonne et déposer 50µl de tampon EB (tampon d'éluion) au centre de la colonne, incuber 1mn puis centrifuger à 13200 tours/mn pendant 1mn
- Conserver le produit à -20°C.

Chapitre II. Travail expérimental

- Réaction de séquence : composition du mélange réactionnel et programme de la réaction (voir en annexe).

- Purification du produit de PCR de séquençage : avec le DYE EX SPIN KIT (réf 63106)

C'est une purification par résine. Cette méthode consiste à enlever tous les résidus provenant de la réaction de séquence de sorte que l'ADN ne soit constitué que des bases à analyser.

- Vortexer les colonnes afin de les mettre en suspension.
- Centrifuger à 3000 tours/mn pendant 3 minutes
- Installer la colonne sur un tube eppendorf identifié
- Déposer délicatement au milieu de la colonne les 20 μ l du produit PCR
- Centrifuger à 3000 tours/mn pendant 3 minutes
- L'ADN pur se retrouve dans le tube eppendorf.
- Evaporer pendant 25mn au speed vac (sans chaleur).
- Ajouter 15 μ l de formamide déionisée.
- Faire bouillir exactement pendant 3mn
- Transvaser aussitôt dans la glace 3mn environ
- Transvaser les 15 μ l dans une plaque
- Mettre la plaque au noir dans le frigo
- Composition du mélange réactionnel:

Le fragment d'ADN à séquencer est obtenu par PCR puis mis en présence d'un milieu réactionnel contenant:

- l'amorce à partir de laquelle la synthèse du nouveau brin sera réalisée par une ADN polymerase,
- les 4 désoxynucléotides (dA, dT, dC, dG)
- les 4 didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) marqués chacun par un fluorochrome distinct
- une ADN polymérase (en général la Taq DNA polymerase).

- Séquençage avec le protocole Big Dye terminator sur l'automate séquenceur ABI PRISM 3100- AvantGenetic Analyser.

Cette analyse est réalisée à l'aide d'un séquenceur automatique: cet appareil est pourvu d'une source laser ou infra-rouge qui excite les fluorochromes portés par les didésoxynucléotides. Cette excitation provoque une émission de lumière à une longueur d'onde dépendant de la nature du fluorochrome.

- Recherche d'homologies des séquences est réalisée grâce au programme de recherche BLASTN et BLASTX au National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.4.10. PFGE

Le PFGE est un type d'électrophorèse et a été développé par Schwartz et Cantor en 1984 afin de séparer les grandes molécules d'ADN (>50 kb) que l'électrophorèse classique sur gel d'agarose ne permettait pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0.4% les gels sont impossibles à manipuler).

2.4.10.1. Principe

Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours de la migration. L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1 kb à une dizaine de mégabases. Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN les cellules sont incluses dans des blocs d'agarose.

L'analyse des profils de macrorestriction d'ADN après électrophorèse en champ pulsé. Après extraction de l'ADN bactérien et digestion par l'enzyme de restriction NotI, les profils obtenus étaient classés et interprétés en utilisant le logiciel Fingerprinting.

2.4.10.2. Technique

Préparation des inserts

Cultiver les échantillons une nuit en boîte de pétri

Inoculer chaque colonie dans un tube stérile de 10ml contenant 3ml de milieu approprié

Inoculer sous agitation dans un incubateur ou dans un bain-marie agité (250t/mn) à 37°C ou à la température optimale 16-20h (une nuit). Pour les bactéries à croissance lente, des incubations peuvent être allongées afin d'en obtenir suffisamment pour la préparation des inserts.

Préparer : bac à glace

Un bain-marie à 50-55°C

Faire fondre l'agarose Clean Cut à 1,2% en utilisant un four à micro-ondes (environ 20 secondes), et le maintenir à 50-55°C (bain-marie) pour couler les inserts.

Placer le cell suspension buffer sur de la glace.

Chapitre II. Travail expérimental

Pipeter 90ul de chaque culture dans un tube et centrifuger à 1 à 2mn à 1000-1200 t/mn.

Éliminer avec précaution le surnageant. Remettre les cellules en suspension dans 150ul de cell suspension buffer froid ; pipeter pour mélanger. Mettre les échantillons à 50°C.

Pour cette étape, traiter chaque tube l'un après l'autre.

Ajouter 6ul de lysozyme et agiter doucement. Ajouter 150ul d'agarose et mélanger. Pipeter immédiatement 100ul du mélange et remplir le moule à insert (éviter les bulles), faire deux inserts par échantillon, laisser solidifier pendant 10 à 15mn à 4°C.

Pipeter 500ul de lysis Buffer 1 et 20ul de lysozyme/lysostaphine dans un tube stérile mélanger par retournement. Démouler les inserts et les plonger dans les tubes préparés. Mélanger et incuber les inserts 1h à 37°C sans agitation.

Éliminer le tampon et rincer avec 1ml de Wash Buffer 1X, éliminer le wash buffer.

Ajouter 500ul de tampon de protéinaseK (20ul). Mélanger par retournement et incuber 16-20h à 50°C sans agitation.

Éliminer la solution de protéinaseK et laver les inserts avec 1ml de wash Buffer 1X pendant 45mn à température ambiante sous agitation douce. Répéter cette étape de lavage trois fois (les inserts peuvent être conservés 3 à 6 mois à 4°C dans 1ml de wash Buffer).

Digestion des inserts

Pour chaque échantillon, transférer in insert dans un tube de 2ml

Laver les inserts et l'insert de contrôle avec 1ml de wash buffer à 0,1X sous agitation douce à température ambiante 3 fois 15mn.

Préparer le tampon de digestion: Tampon H (10X) : 900µl

H₂O maxima: 8,1ml

Tampon de restriction (XBal) : 9ml

Pré-incubation :

Ajouter 600µl de tampon de digestion dans chaque tube

Incuber 30 à 60mn à température ambiante

Digestion :

Pour chaque insert, ajouter :

300µl de tampon de digestion

10µl d'enzyme de restriction (XBal)

Incuber 16-20h à 37°C

Arrêter la digestion en ajoutant 10µl d'EDTA 0.5X, incuber 30min à 37°C.

Éliminer le tampon et ajouter 500µl de wash Buffer 1X les inserts peuvent être conservés 2 à 4 semaines à 4°C.

Chapitre II. Travail expérimental

Protocole de préparation du gel

Préparer 300 ml de tampon TBE 0,25 X.

Peser la quantité d'agarose correspondant à la concentration désirée.

Dans un erlenmeyer de capacité suffisante (2-3 fois le volume du gel), mettre le tampon et ajouter la poudre d'agarose. Peser le tout.

Dissoudre l'agarose dans un four à micro-ondes jusqu'à disparition complète des particules d'agarose : la solution doit devenir limpide. Repeser et réajuster le volume avec de l'eau distillée.

Refroidir l'erlenmeyer au bain marie à 50°C.

Placer le cadre sur le portoir du gel puis positionner le peigne.

Verser le gel d'agarose dans le moule et laisser solidifier (au moins 30 min).

Protocole d'électrophorèse

Enlever délicatement le peigne et les barrettes.

Placer les blocs et les marqueurs de taille dans les puits.

Mettre du tampon TBE 0,25 X dans la cuve à champ pulsé et le refroidir à la température souhaitée pour la migration. Il faut avoir mis en marche le système de refroidissement de la cuve quelques heures auparavant.

Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse.

Programmer la migration. Ce programme dépend de la taille des fragments à séparer. Dans le cas de l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*, les conditions suivantes permettent de résoudre tous les chromosomes :

Temps de pulse initial 60 s

Temps de pulse final 120 s

Temps de migration 72 h

Volt/cm 6

Angle 120°

Température 14°C

NB: Porter des gants pour manipuler le matériel contenant du bromure d'éthidium et porter un masque et des lunettes de protection spéciales devant l'appareil à UV

Arrêter l'appareil à champ pulsé, sortir le gel et le déposer dans un bac contenant une solution de BET à une concentration finale de 0,01 µg/ml. Colorer le gel pendant 30 min.

Pour observer les fragments d'acides nucléiques, utiliser les UV $\lambda = 254$ nm, s'il s'agit de fragments d'ADN à extraire, utiliser les UV $\lambda = 320$ nm.

IV. Résultats

Résultats

1. Données épidémiologiques

L'échantillonnage s'est déroulé de 2009 à 2010 dans les structures sanitaires. Des échantillons de selles ont été collectés chez des patients diarrhéiques (enfants et adultes), hospitalisés ou consultant à titre externe dans les structures de santé de la ville de Dakar (l'Institut d'Hygiène Sociale et le centre de santé Gaspard Camara) et de sa banlieue (Roi Baudouin de Guédiawaye, l'Institut de Pédiatrie Sociale de Pikine, Baye talla Diop ex Dominique, Parcelles Assainies, Sicap-Mbao) et dans les hôpitaux de régions (Thiès et Diourbel-Touba). Le climat est de type sahélien, avec une saison des pluies au cours de Juin à Octobre et une saison sèche de Novembre à Mai. Au niveau des sites, les centres de santé Roi Baudouin de Guédiawaye, Mbao et le dispensaire Saint Martin de Reubeuss ont constitué les greniers de cet échantillonnage (tableau IV). La majorité des patients résidaient dans la banlieue dakaroise. Ces zones sont situées dans la partie centre ouest du pays (550 km² soit 0,3% de la superficie totale), avec une population estimée à 3 millions d'habitants soit 22% de la population totale du Sénégal (données de l'ANSD du Troisième Recensement Général de la Population et de l'Habitat – RGPH – 2002).

2. Les analyses statistiques

Les analyses des données ont été effectuées dans Microsoft Excel et le logiciel R version 2.13.0 (2011). Les analyses statistiques pour la détermination du taux de faux positifs des valeurs p ont été utilisées par la méthode d'ANOVA. Quand une valeur de cellule attendue était <5, le test exact de Fisher a été utilisé. La signification statistique a été indiquée à p <0,05.

3. Population d'étude

La population a été choisie dans les centres de santé décrits dans cette étude. Adultes et enfants ont été inclus. Les patients souffrant de diarrhée (281) (59,7%) et les patients ne présentant pas de diarrhée (190) (40,3%) ont été inclus dans cette étude. La moyenne d'âge était de 21,75 ± 19,8 avec un intervalle de (1 enfant de 9 jours et 1 patient âgé de 87 ans). Le sex-ratio homme / femme était de 1,01.

4. Culture microbienne

Culture

Avec 9 différentes conditions de culture utilisées, environ 7.900 colonies ont été testées par la

Résultats

spectrométrie de masse MALDI-TOF. Plus de 15.733 spectres ont été analysés. Au total, 2.753 isolats ont été testés et nous ont permis d'identifier 189 espèces bactériennes dont une espèce inconnue. Ces espèces étaient réparties dans 5 phylums, 27 genres, dont 21 espèces jamais décrites dans l'intestin et 3 champignons. Deux échantillons de selles de patients souffrant de diarrhée ne permettaient pas de récupérer des bactéries en culture. Des champignons tels que *Candida albicans* ont été détectés à partir de 3 patients atteints de diarrhée. Par MALDI-TOF, les bactéries ont pu être identifiées avec un bon score du genre et de l'espèce. Une moyenne de $8,6 \pm 3$ espèces bactériennes différentes a été identifiée chez les patients sans diarrhée (de 1 à 18) alors qu'une moyenne de $7,3 \pm 3,4$ espèces bactériennes différentes a été identifiée parmi les patients atteints de diarrhée (de 0 à 22). Globalement, le nombre d'espèces de bactéries dans les selles était significativement plus fréquent chez les patients sans diarrhée que ceux avec ($p = 0,0003$). Enfin, 59 des 153 espèces bactériennes (38,6%) identifiées chez les patients souffrant de diarrhée étaient spécifiques de ce groupe alors que 36 des 129 espèces bactériennes (27,9%) identifiées chez les patients sans diarrhée étaient spécifiques de ce groupe, mais la différence n'était pas significative ($p = 0,059$).

Trente-deux isolats des 2750 (1,2%) n'ont pas pu être identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. D'où le recours au séquençage de l'ARN 16S, qui nous a permis d'identifier 11 espèces: *Bacteroides nordii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus thuringiensis*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium neonatale*, *Paenibacillus polymyxa*, *Staphylococcus sciuri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei* et deux nouvelles espèces: une nouvelle espèce *Clostridium* qui a été appelée *Clostridium dakarensis* (Numéro d'accession Genbank KC517358) et une nouvelle espèce de *Bacillus*, *Bacillus casamencensis* (Numéro d'accession Genbank AF519462.1). La séquence de l'ARNr 16S de ce bacille a montré que cette espèce a déjà été détectée dans les sols de riz au Sénégal, mais aucune description de la bactérie n'a encore été rapportée. Les autres isolats comprenaient 1 sur 2 *Parabacteroides goldsteinii*, 1 sur 2 *Aneurinibacillus migulanus*, 2 (11%) de 18 *Bacillus amyloliquefaciens*, 1 sur 2 *Bacillus endophyticus*, 1 (7,7%) de 13 *Bacillus licheniformis*, 2 (7,7%) de 26 *Bacillus pumilus*, 3 (8%) de 37 *Bacillus subtilis*, 1 sur 4 *Clostridium clostridioforme*, 1 sur 13 (7,7%) *Clostridium lituseburense*, 1 (7,7%) de 13 *Kurthia gibsonii*, 1 de 4 *Lactococcus lactis*, 1 (4%) de 25 *Lysinibacillus fusiformis*, 1 sur 2 *Lysinibacillus sphaericus*, 1 sur 2 *Ruminococcus gnavus*, 1 (8,3%) de 12 *Weissella ciberia*, et 2 (18,2%) de 11 *Acinetobacter baumannii*. Quand les spectres des isolats précités ont été ajoutés à la base de données Brucker, les identifications ultérieures étaient exactes.

Résultats

Bactéries commensales retrouvées

Sept espèces bactériennes (3,7%) ont été identifiées plus de 100 fois dans les selles (261 *Escherichia coli*, 256 *Enterococcus faecium*, 159 *Clostridium bifermentans*, 153 *Enterococcus faecalis*, 152 *Clostridium perfringens*, 137 *Bacillus cereus*, et 106 *Enterococcus hirae*), étonnamment plusieurs bactéries étaient plus fréquentes chez les patients sans diarrhée tels que: *E. coli* ($p < 10^{-3}$), *E. faecium* ($p < 10^{-3}$), *C. bifermentans* ($p = 0,002$), et *C. perfringens* ($p < 10^{-3}$). Trente-neuf espèces bactériennes (20,6%), identifiées à partir de 18 différents genres ont été identifiées 10 à 100 fois dans les selles (voir tableau en annexe). Plusieurs étaient plus fréquentes chez les patients atteints de diarrhée comme *Bacillus licheniformis* ($p = 0,02$), *Bacillus pumilus* ($p = 0,002$), et *Staphylococcus aureus* ($p = 0,01$). En revanche les personnes sans diarrhée avaient plus communément *Lysinibacillus fusiformis* ($p = 0,001$), *Clostridium orbiscindens* ($p = 0,01$), *Clostridium symbiosum* ($p = 0,03$), *Enterococcus casseliflavus* ($p = 0,03$), *Kurthia gibsonii* ($p = 0,02$), et *Collinsella aerofaciens* ($p = 0,01$), *Eggerthella lenta* ($p = 0,004$), *Bacteroides uniformis* ($p = 0,001$) et *Bacteroides vulgatus* ($p = 0,03$) (figure 38).

Espèces bactériennes rares

Dans l'ensemble, 81 des 189 espèces bactériennes (43%) ont été identifiées à partir de 2 à 10 selles (tableau voir annexe 4). Parmi eux, *Bifidobacterium breve*, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus mojavensis*, *Fingoldia magna*, et *Streptococcus anginosus* ont chacune été détectée 4 fois et uniquement chez les patients atteints de diarrhée ($p = 0,047$). *Staphylococcus haemolyticus* était seulement retrouvée chez 5 patients atteints de diarrhée ($p = 0,02$). *Staphylococcus epidermidis* a été significativement plus fréquemment détectée chez les personnes souffrant de diarrhée (7/162) que ceux sans (1/185, $p = 0,02$). En revanche, *Eubacterium limosum* n'a été identifiée que chez 5 personnes sans diarrhée ($p = 0,04$).

Espèces bactériennes isolées une seule fois

Au total, 51 espèces bactériennes ont été identifiées qu'une seule fois (tableau voir annexe 4). Parmi eux, 5 espèces de bactéries du phylum Actinobacteria ont tous été détectées chez les patients souffrant de diarrhée ainsi que des espèces du genre *Bacillus* (5 espèces bactériennes différentes), *Clostridium* (4), et *Shigella* (2). En revanche plusieurs espèces des genres *Bacteroides* (4) et *Enterococcus* (2) n'ont été détectées que chez les patients sans diarrhée. Les espèces de bactéries identifiées ont été classées en cinq phylums: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria et Fusobacteria. Le phylum le plus retrouvé

Résultats

était les Firmicutes représentant plus de 64% de la flore totale, suivi du phylum des Protéobactéries de 21%, Bacteroidetes 10% et des Actinobactéries 4%. Fusobacteria a été détecté chez une seule personne adulte (1%). Les genres *Clostridium* et *Enterococcus* ont été les plus retrouvés dans le phylum des Firmicutes, représentant une proportion moyenne de 24% et 18,4% respectivement.

Aucune différence statistiquement significative entre la répartition des phylums dans les groupes n'a été observée avec l'analyse de variance ($p=0,9988$) (test ANOVA).

Résultats

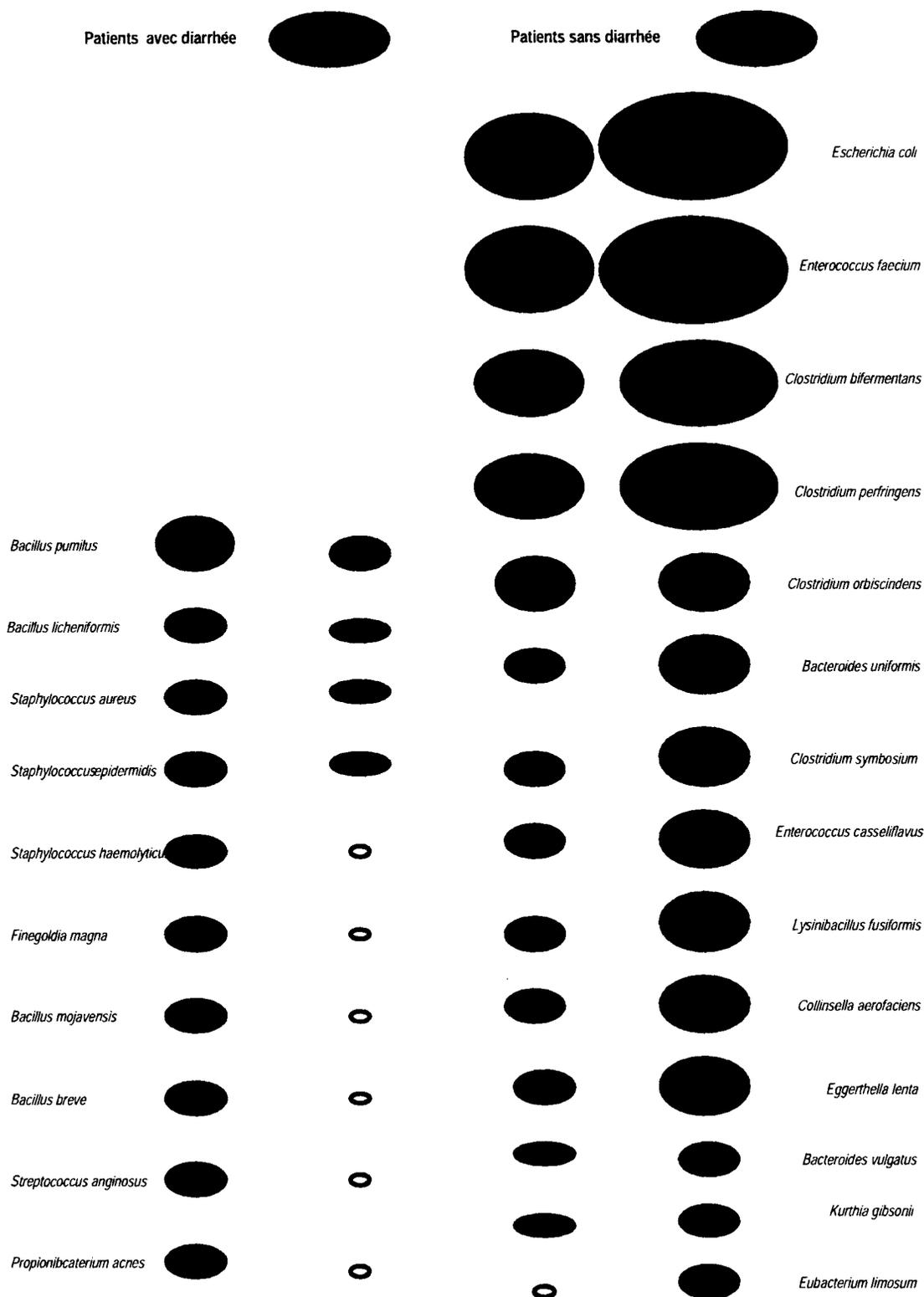


Figure 24: Espèces bactériennes pour lesquelles des différences significatives ont été observées entre les patients souffrant de diarrhée et ceux sans.

5. Résultats sur les étiologies des diarrhées infectieuses

5.1. Données cliniques des patients

Un total de 511 prélèvements (301 selles de patients diarrhéiques et 210 selles de patients non diarrhéiques) ont été étudiés. La population d'étude a été répartie en différentes classes d'âges (voir tableau III). Le sex-ratio était de 1,3 avec une légère prédominance du sexe masculin. La moyenne d'âge était de 17 ans avec des extrêmes de 46 jours et 87 ans.

5.2. Données épidémiologiques

La répartition du nombre de patients selon l'année est représentée sur la figure 24 avec beaucoup de prélèvements obtenus pendant les mois de Juin à Octobre correspondant à la période hivernale au Sénégal.

Tableau III : Répartition de la population étudiée

Classes d'âge	Nombre		Total (%)
	Patients	Contrôles	
0-1	45	0	45 (8,8)
2-5	101	12	113 (22,1)
6-15	35	29	64 (12,5)
16-45	74	130	204 (39,9)
46-60	25	23	48 (9,4)
> 60	15	8	23 (4,5)
Inconnu	6	8	14 (2,5)
Total	301	210	511 (100)

5.3. Analyses descriptives sur la population présentant une diarrhée

Ce sont des analyses faites sur toute la population d'étude qui présentaient une diarrhée.

Tableau IV : Patients présentant une diarrhée

	Population
Région	
Dakar	281
Thiès	9
Touba	11

Résultats

Site étude	
1	17
2	7
3	34
4	70
5	22
6	3
7	73
8	75
Ville de résidence	
Dakar	63
Mbao	56
Pikine	58
Guediawaye	61
Thiès	14
Touba	11
Inconnu	38
Année	
2009	138
2010	163
Saison	
Pluie (juin-octobre)	185
Sèche (novembre-mai)	116
Sexe (M/F)	169/132
Classe d'âge	
[0-1]	45
]1-5]	101
]5-15]	36
]15-45]	73
]45-60]	25
]60-100]	15
inconnu	6
Age (moy-extrêmes)	17 ans [46 jours-87 ans]
Température (moy-extrêmes)	37,4 [36,1-40,0]
Déshydratation (n/N)	62/290
Vomissement	116/294
Douleurs abdo	204/294
Asthénie	121/293
Selles dures	6/301
Selles molles	93/301
Selles liquides	118/301
Selles glaireuses	111/294
Selles sanguinolentes	35/294

Résultats

Hospitalisés	69/301
Délai diarrhée-consultation [moy-extrêmes]	6,0 jours [0-174]

Cette figure montre la répartition de la population d'étude en fonction des zones d'études.

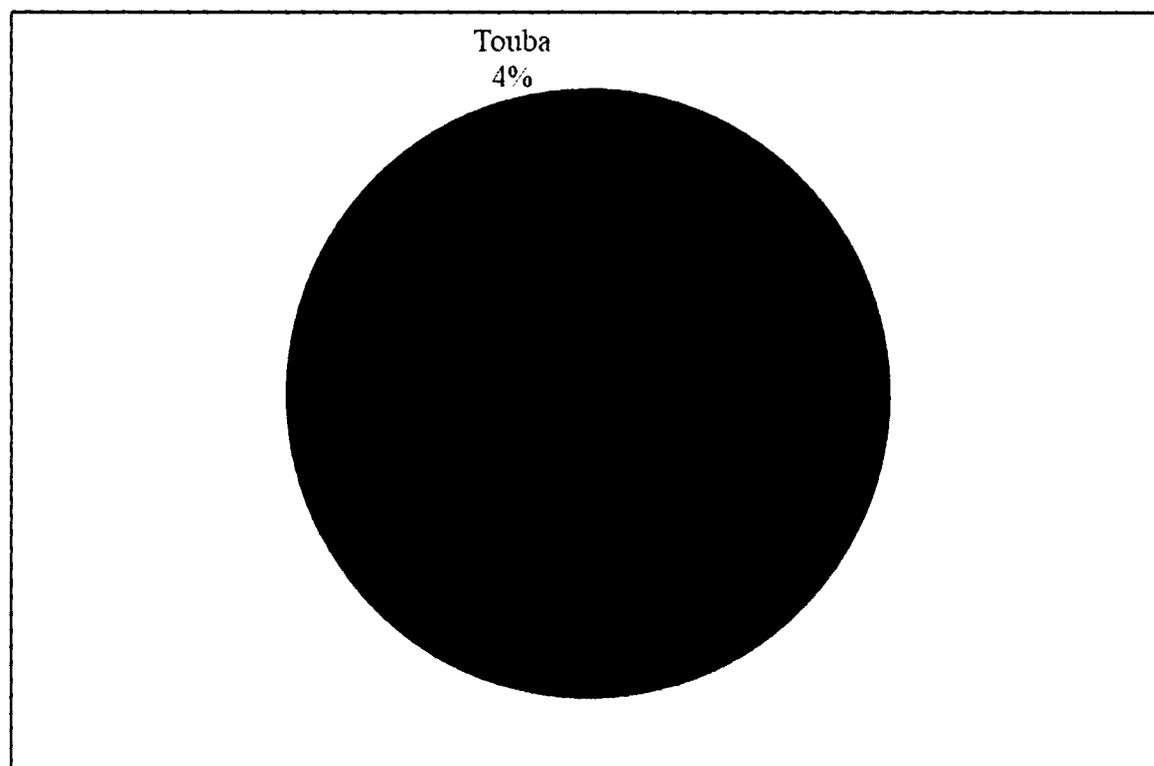


Figure 25 : Répartition des patients par zones d'étude

Résultats

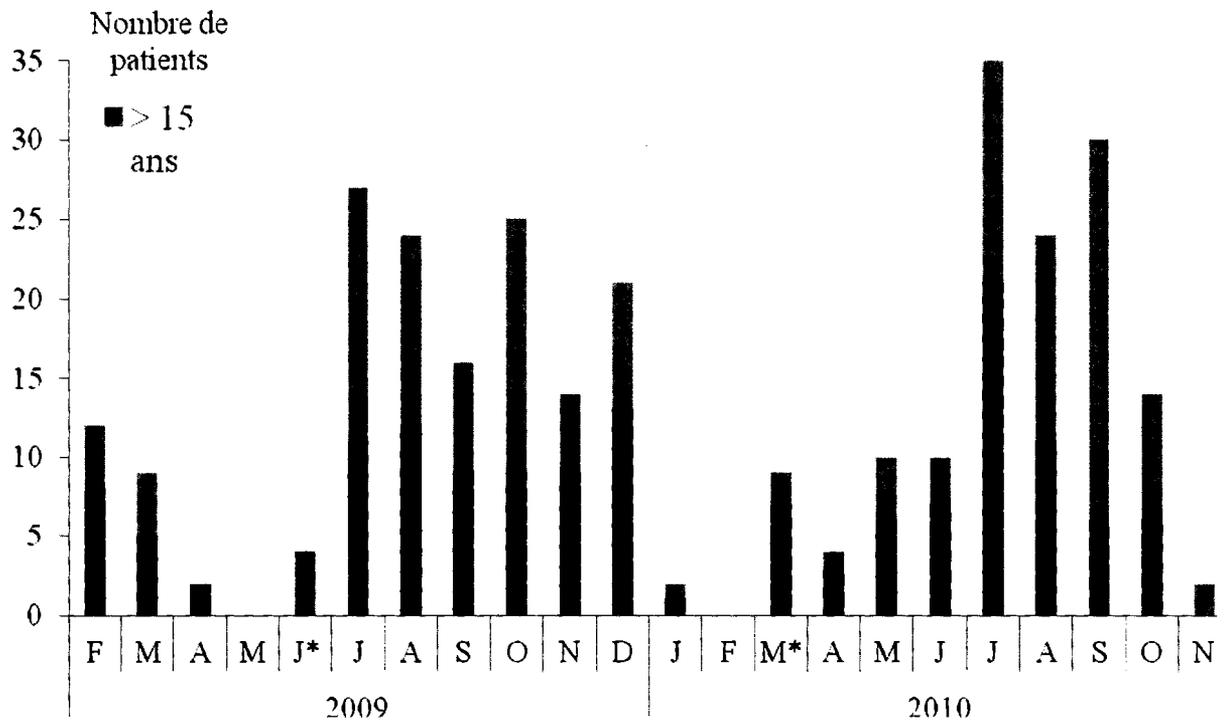


Figure 26 : Répartition mensuelle des patients par classes d'âge

Chez les patients la température axillaire moyenne était de 37,4°C avec des extrêmes de 36,1°C et 40°C. La plupart des patients présentaient une diarrhée accompagnée de douleurs abdominales (69%) et de vomissements (39%) mais avec de rares cas de déshydratation (21%).

Seuls 69 patients étaient hospitalisés (23% des patients).

5.4. Aspect des selles

Les selles étaient le plus souvent liquides (39%) et/ou glaireuses (37%). La présence de sang dans les selles était notée dans 12% des cas. Cependant, dans certains cas de diarrhées, les selles pouvaient être molles (31%).

5.5. Analyses descriptives des patients n'ayant pas pris d'antibiotiques

Ce sont des analyses faites sur la sous population de patients venus en consultations externes ou hospitalisés (<48h) et qui n'avaient pas pris d'antibiotique ou d'antiparasitaire quinze avant l'inclusion. Ces patients étaient au nombre de 241.

Résultats

Tableau V: Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des 241 patients atteints de diarrhée, de 2009 à 2010.

Régions	Population (n= 241)
Dakar	231
Thiès	5
Diourbel (Touba)	5
Zone (relative au site étude)	
Dakar	67
Mbao	63
Pikine	44
Guediawaye	57
Zone de résidence	
Dakar	52
Mbao	49
Pikine	49
Guediawaye	49
Thiès	7
Touba	6
Année	
2009	106
2010	135
Saison	
Pluie (juin-octobre)	161
Sèche (novembre-mai)	80
Sexe (M/F)	132/109
Sex-ratio	1,2
Classes d'âge	
[0-1]	54
]1-5]	62
]5-15]	32
]15-45]	60
]45-60]	22

Résultats

60-100]	11
Age (moy-extrêmes)	6 ans [46 jours – 87 ans]
Température (moy-extrêmes)	37,4 [36,1 - 40,0]
Déshydratation (n/N)	39/225
Vomissement	88/235
Douleurs abdominales	169/231
Asthénie	94/220
Selles dures	5/240
Selles molles	69/241
Selles liquides	96/240
Selles glaireuses	89/240
Selles sanguinolentes	32/240
Hospitalisés	34/241
Délai diarrhée-consultation (moy-extrêmes) / (mediane-IQR)	5,7 jours [0-94] 2 [4]

La durée moyenne des symptômes diarrhéiques, tel que rapporté par les patients avant la consultation, a été de 3,7 jours [0-28 jours]. Les principaux symptômes rapportés étaient des douleurs abdominales (169/231, 73%), une asthénie (94/220, 42,7%) et des vomissements (88/235, 37%) (Tableau V). À l'examen clinique, 37,8% (79/209) des patients ont été jugés fébriles et 17,3% (39/225) ont montré une déshydratation. La déshydratation a été plus fréquemment observée chez les enfants de moins de 5 ans (valeur $p = 0,002$), tandis que la douleur abdominale a été plus fréquemment rapportée par les patients de plus de 5 ans (valeur $p = 0,002$). Une diarrhée persistante (durée > 14 jours) a été observée chez 8 patients (3,8%), dont 6 étaient des enfants de moins de 5 ans. Parmi les 241 patients, 34 (14%) ont été hospitalisés et aucun décès n'a été signalé. Parmi les 241 échantillons, l'observation directe a montré la présence de glaire dans 89 prélèvements de selles (37,2%) et le sang chez 30 (13,4%). De plus, le mucus a été plus fréquemment observé dans les selles provenant d'enfants de moins de 5 ans ($p = 0,02$), alors que le sang a été plus fréquemment détecté dans les selles de patients de plus de 5 ans (valeur $p = 0,006$) (tableau V).

Résultats

L'analyse de ce groupe qui représentait la grande majorité des patients n'a pas montré de grandes différences par rapport aux résultats de l'ensemble des patients sur le plan clinique et épidémiologique, sauf au niveau de l'âge.

6. Analyse microbiologique

6.1. Agents parasitaires retrouvés

L'examen parasitologique a permis de retrouver beaucoup de parasites dans les selles aussi bien chez les patients (n=301) que chez la population contrôle (n=210) et dans les différentes tranches d'âge. Nous avons pu identifier des parasites aussi bien chez les enfants que chez les adultes. Les œufs d'*Ascaris lumbricoïdes* ont été retrouvés en majorité (n=53; 38%), suivis de *Enterobius vermicularis* (n=48; 34%) *Schistosoma mansoni* (n=8; 5,8%) et *Giardia lamblia* (n=10; 7%) et ont été retrouvés le plus souvent chez les enfants. D'autres espèces telles que *Trichomonas intestinalis* (n=9; 6,5%), *Cryptosporidium* (n=6; 4,3%) ; *Microsporidium* (n=3; 2%) ont également été retrouvées (figure 26) ainsi que des levures (n=4).

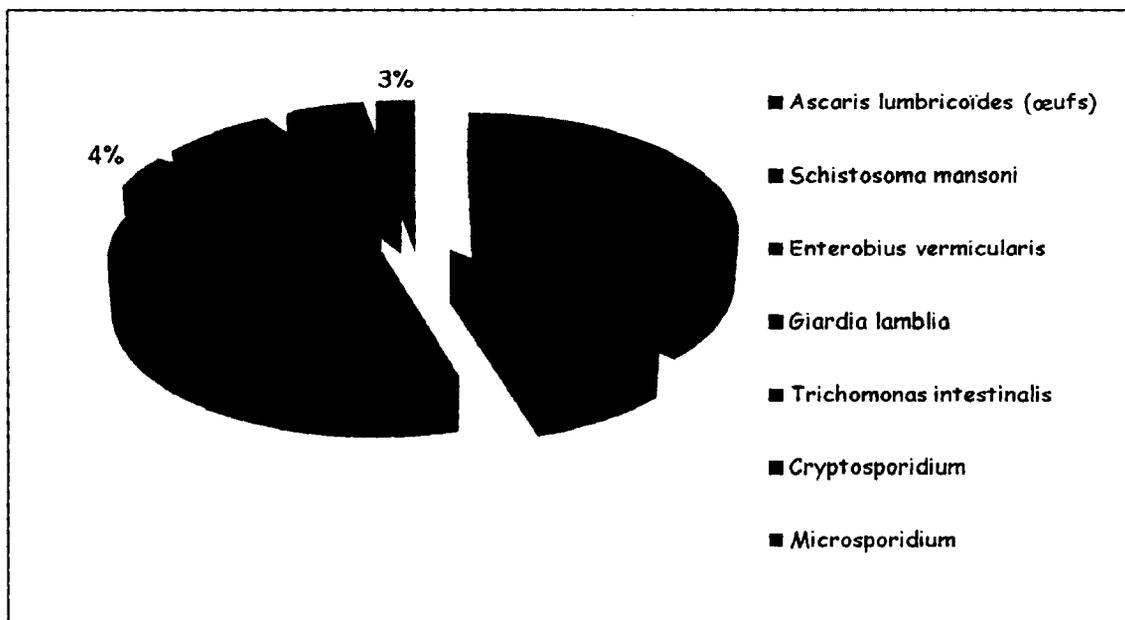


Figure 27 : Répartition des parasites retrouvés

6.2. Agents viraux retrouvés

Les virus étaient recherchés chez tous les enfants et les adultes qui présentaient une diarrhée sévère.

Résultats

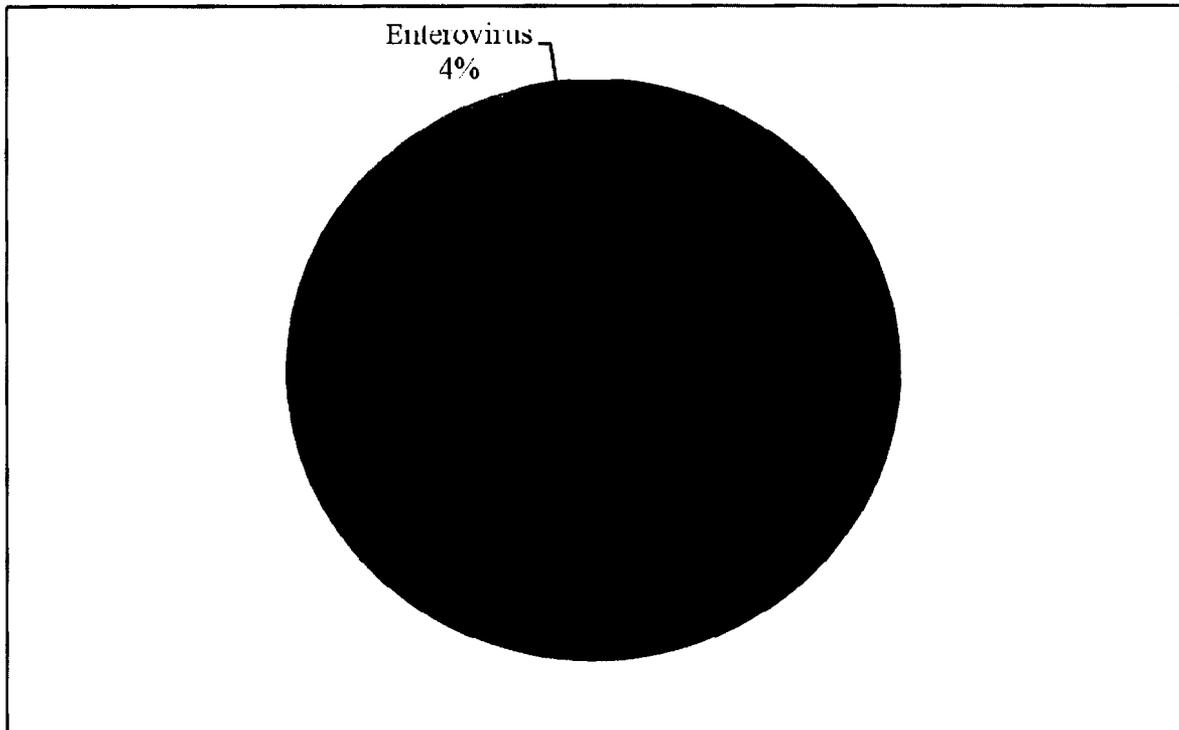


Figure 28 : Répartition des étiologies virales

Les virus pouvaient aussi être des agents responsables de diarrhée surtout chez les enfants. Rotavirus était le plus retrouvé (n=43), suivi de Adenovirus (n=24). Avec la microscopie électronique, nous avons détecté dans des selles d'enfants et d'adultes d'autres virus tels que Enterovirus (n=3) et Calicivirus (n=7) qui peuvent être responsables de diarrhées. Les Enterovirus ont été retrouvés chez des enfants dont la tranche d'âge est de 1 an à 6 ans. Les Calicivirus étaient plus détectés chez des enfants dont l'âge est compris entre 4 mois et 6 ans.

Tableau VI : Pourcentage des virus chez les enfants

Pourcentage des virus (%)	Age des enfants				
	0 - 3mois	4 - 6 mois	7 - 12mois	13 mois- 5 ans	6 ans – 15 ans
Rotavirus	40	8	27,5	20,5	2,5
Adenovirus	20	2	12,8	5	0
Rota+Adeno	4	0	7,6	0	0
Calicivirus	0	28,5	14,5	42,5	14,5
Enterovirus	0	0	66	0	33

Résultats

Le tableau ci-dessus indique le pourcentage de répartition des virus retrouvés chez les enfants. Les virus sont des agents étiologiques de diarrhée. Les Rotavirus ont été les plus retrouvés dans toutes les tranches d'âge particulièrement chez les enfants âgés de moins de trois mois. Chez certains enfants, la diarrhée peut aussi être due par la présence des Adenovirus et Rotavirus à la fois. Aucun virus n'a été retrouvé chez un patient témoin.

Les virus sont des agents responsables de diarrhée sévère surtout chez les enfants (exemple Rotavirus retrouvé chez un bébé de 46 jours). Les diarrhées virales surviennent pendant la période de froid allant de novembre à février et n'ont pas de traitement particulier en dehors de la réhydratation.

6.3. Agents bactériens pathogènes

Les agents bactériens classiques de la diarrhée tels que *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* et des bactéries non spécifiques de la diarrhée étaient retrouvés.

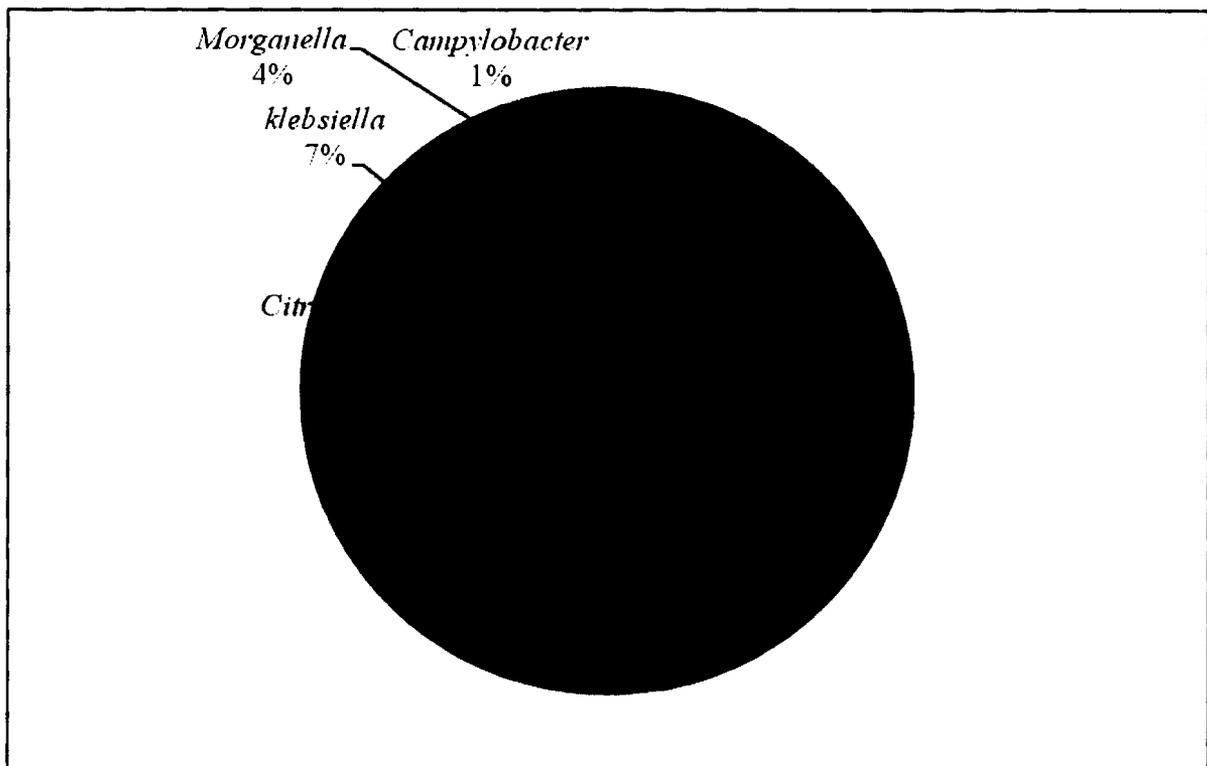


Figure 29 : Répartition des bactéries pathogènes isolées

Résultats

Tableau VII : Bactéries pathogènes spécifiques

	<i>Escherichia coli</i>	80
<i>Shigella</i>	<i>Shigella flexneri</i>	21
	<i>Shigella sonnei</i>	4
	<i>Shigella dysenteriae A2</i>	1
	<i>Shigella boydii</i>	1
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	1
<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	1
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> Hillingdon	1
	<i>Salmonella</i> Poona	1
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	3
	<i>Salmonella</i> Putten	1
	<i>Salmonella</i> Nima	1
	<i>Salmonella</i> Typhi	2
	<i>Salmonella</i> Chile	1
	<i>Salmonella</i> Miami	1
	<i>Salmonella</i> Somone	1
<i>Salmonella</i> Enteritidis	6	

Dans cette étude, nous avons isolé 21 souches de *Shigella flexneri* qui était l'espèce prédominante parmi les shigelles, suivi de *Shigella sonnei* (n=4), *Shigella dysenteriae A2* (n=1) et *Shigella boydii* (n=1) (tableau VII).

Nous avons isolé et identifié 18 *Salmonella enterica* dont 16 non Typhi: *Salmonella* Hillingdon (n=1), *S. Poona* (n=1), *S. Typhimurium* n=3), *S. Putten* (n=1), *S. Chile* (n=1), *S. Somone* (n=1), *S. Nima* (n=1), *S. Miami* (n=1), *S. Enteritidis* (n=6) et 2 *Salmonella* Typhi. *Salmonella* Typhi est l'agent de la fièvre typhoïde qui est une maladie très grave et endémique dans les pays tropicaux.

Quatre vingt souches d'*Escherichia coli* (tableau VII) ont été isolées et sont considérées comme pathogènes car isolées en culture pure. Les facteurs de virulence ont été recherchés chez des souches de *Escherichia coli* isolées de patients diarrhéiques. Chez les témoins nous n'avons pas recherché ces facteurs de virulence.

Résultats

6.4. Bactéries pathogènes non spécifiques

La diarrhée n'est pas toujours due aux parasites, aux virus ou aux bactéries spécifiques. En fait, certaines bactéries commensales peuvent être des agents pathogènes lorsque l'équilibre intestinal est rompu. Chez les personnes immunodéprimées ou chez les nourrissons ce phénomène peut être observé. Ces bactéries non spécifiques sont considérées pathogènes lorsqu'elles sont isolées en culture pure (voir tableau VIII).

Tableau VIII : Bactéries pathogènes non spécifiques

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Nombre de souches	6	3	4	2	2

7. Phénotypes de résistance

L'antibiogramme a été réalisé et la lecture était faite selon les recommandations du CASFM 2009. Il y'avait une forte multirésistance notée chez les bactéries isolées. Trois phénotypes majeurs ont été observés:

Le premier phénotype est ACSSuTe qui montrait une pentarésistance simultanée à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la spectinomycine, aux sulfamides et à la tétracycline qui sont des antibiotiques de première ligne utilisés dans le traitement des diarrhées. La majorité des souches testées (90%) étaient résistantes à ces antibiotiques dits de première ligne. Ces résistances étaient beaucoup plus notées chez les genres *Shigella* et *Escherichia coli*. Le deuxième phénotype était GIC montrant une résistance à la gentamicine, à l'imipénème et aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération C1 et C2. Les résistances à l'imipénème ont été notées chez sept souches de *Escherichia coli* et une souche de *Shigella flexneri*. Cependant toutes les autres souches étaient sensibles à l'imipénème. Les souches étaient pour la plupart sensibles aux céphalosporines de 3ème génération. Le dernier phénotype montrait une résistance ponctuelle à l'acide nalidixique. La résistance de *Escherichia coli* aux quinolones s'est déjà établie. Trente neuf souches étaient résistantes à l'acide nalidixique soit un pourcentage de 26%. Dans cette étude nous avons constaté une émergence de la résistance aux quinolones. En effet, une souche de *Shigella flexneri* résistante à l'acide nalidixique a été isolée chez un enfant de 16 mois. Cinq souches de *Salmonella* (*S. Hillingdon* n=1 et *S.*

Résultats

Enteritidis n=4), la souche de *Aeromonas sobria* et *Campylobacter* étaient résistantes à l'acide nalidixique.

8. Les concentrations minimales inhibitrices CMI

Les CMI ont été étudiées uniquement pour les souches de *Shigella* et *Salmonella*. Sur les 27 souches de *Shigella flexneri* testées, une était résistante à l'acide nalidixique et sensible à la ciprofloxacine. Parmi les souches de *Salmonella* (n=18), cinq étaient résistantes à l'acide nalidixique et de sensibilité diminuée pour la ciprofloxacine.

Tableau IX : Détermination des CMI chez *Shigella* et *Salmonella*

Souches	Nombre	Phénotypes de résistance		CMI (ug/ml)	
		Acide nalidixique	Ciprofloxacine	Acide nalidixique	Ciprofloxacine
<i>Shigella flexneri</i>	1	R	S	≥ 256	0,94
<i>Salmonella</i>	4	R	I	≥ 256	1,25
	1	R	R	≥ 256	1,9

9. Les résistances chez *Shigella*

La totalité des souches de *Shigella* isolées étaient résistantes à presque tous les antibiotiques dits de première ligne (cotrimoxazole, tétracyclines, bêtalactamines). Le phénotype majeur (observé chez plus de 50% des souches) était du type ACSSuTe, de résistance simultanée à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfamides et aux tétracyclines. Une souche de *Shigella flexneri* présentait une résistance à l'imipénème et aux céphalosporines de 2^{ème} et 3^{ème} générations. En 2010, une souche de *Shigella flexneri* résistante à l'acide nalidixique a été retrouvée.

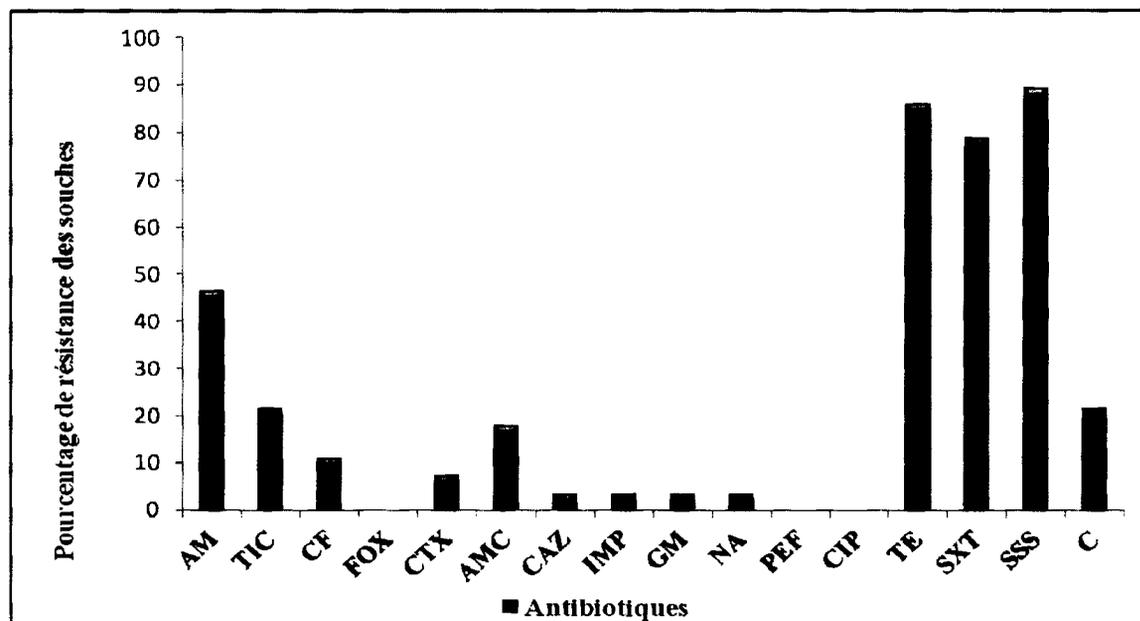


Figure 30 : Profil de résistance de *Shigella* vis à vis des antibiotiques

AM: ampicilline; TIC: ticarcilline; CF: céfalotine; FOX: céfoxitine; CTX: céfotaxime ; AMC: amoxicilline + acide clavulanique; CAZ: ceftazidime; IMP; imipénème; GM: gentamicine; NA: acide nalidixique; PEF: péfloxacine ; CIP: ciprofloxacine; TE: tétracycline; SXT: triméthopri-me-sulfaméthoxazole; SSS: sulfamides forts; C: chloramphénicol.

10. Les résistances chez *Salmonella*

Les souches de *Salmonella* étaient dans la majorité sensibles aux différentes classes d’antibiotiques testés, cependant cinq souches étaient résistantes à l’acide nalidixique (*Salmonella* Hillingdon et Enteritidis (n=4). L’acide nalidixique étant le marqueur de résistance des quinolones chez *Salmonella*, toute souche résistante à l’acide nalidixique résiste aux autres quinolones, y compris les fluoroquinolones selon le CASFM.

12. Les facteurs de virulence

La recherche de facteurs de virulence a été faite essentiellement sur les souches de *Escherichia coli* isolées en culture pure et considérées comme pathogènes. Les souches pathogènes de *Escherichia coli* sont classiquement divisées en souches entérotoxigènes, entéro-pathogènes, entérohémorragiques, entéro-aggrégatifs, entérohémorragiques, entéro-invasives et à adhésion diffuse selon le gène de virulence qu'elles portent.

Cinq différents pathotypes de *Escherichia coli* ont été retrouvés dans cette étude. *Escherichia* à adhérence diffuse (DAEC) et entéro-pathogènes (EPEC n=20) ont été le plus souvent retrouvés chez les enfants, de même que les ETEC. Deux souches productrices de *SLTII* (toxine caractérisant *Escherichia coli* entérohémorragique) avaient été retrouvées chez un adulte et chez un enfant.

Certaines souches de *Escherichia coli* présentaient à la fois de deux ou trois facteurs de pathogénicité différents. Ainsi, il a été retrouvé une souche portant les gènes *afa* + *eagg* + *LT*, une autre souche avec les gènes *bfp* + *eagg*, deux souches ayant les gènes *afa* + *bfp* et deux souches portant *afa* + *LT*. Toutes ces souches avaient été isolées chez des enfants.

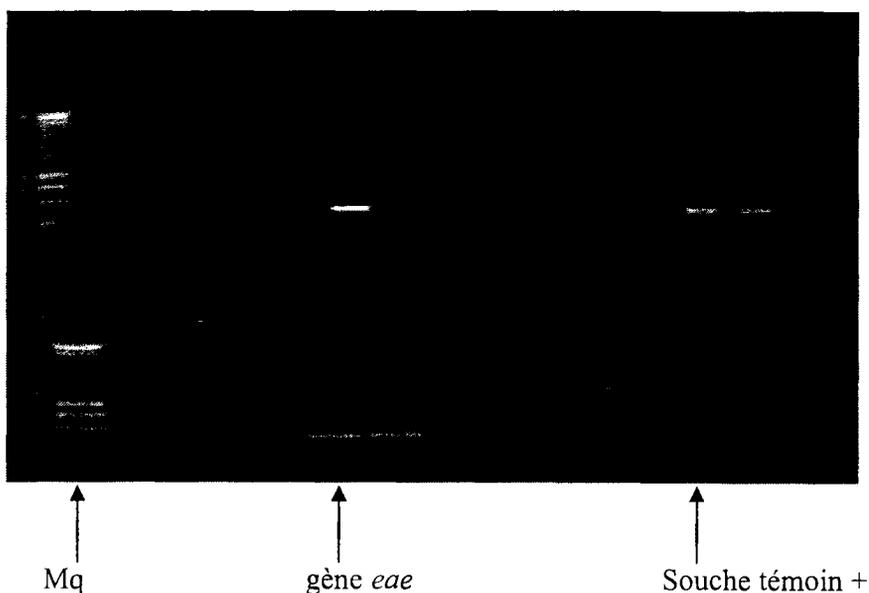


Figure 32: Photo de gel de la PCR du gène *eae* chez *E.coli*

Résultats

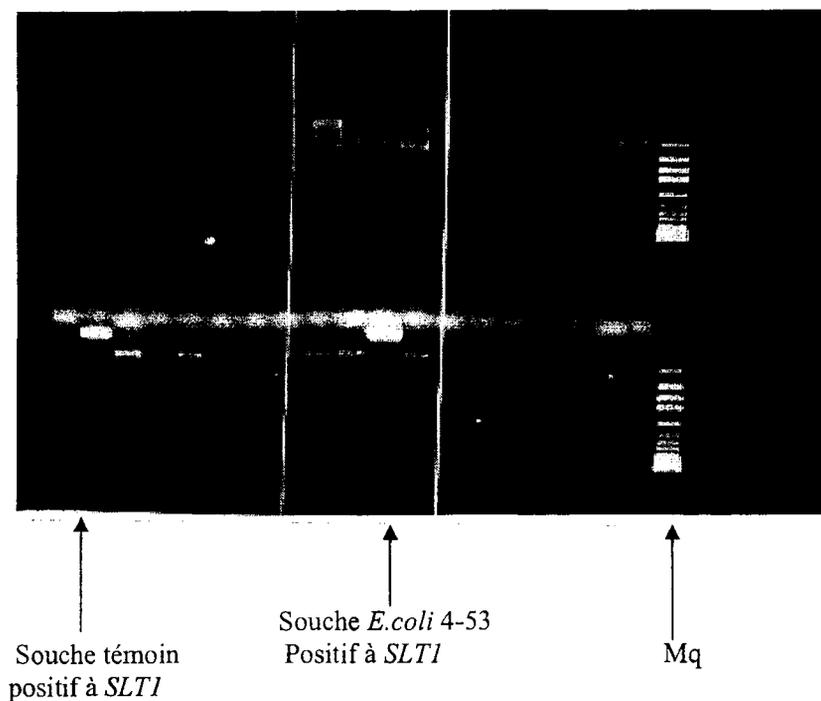


Figure 33: Photo de gel des gènes *SLT1* et *SLT2* de souches *E.coli*

Tableau X : Différents facteurs de virulence de *Escherichia coli*

Pathotypes	Gènes de virulence	Nombre	
		Enfants (181)	Adultes (120)
<i>E. coli</i> à adhérence (diffuse DAEC)	<i>afa</i>	11	1
<i>E. coli</i> entéroaggrégatifs (EAgg EC)	<i>eagg</i>	6	0
<i>E. coli</i> entéropathogènes (EPEC)	<i>bfp, eae</i>	20	3
<i>E. coli</i> entéroinvasifs (EIEC)	<i>ipah</i>	0	0
<i>E.coli</i> entérotoxinogènes (ETEC)	<i>LT</i>	5	0
<i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC)	<i>SLT</i>	1	1

13. Les résistances chez *Escherichia coli* pathogène

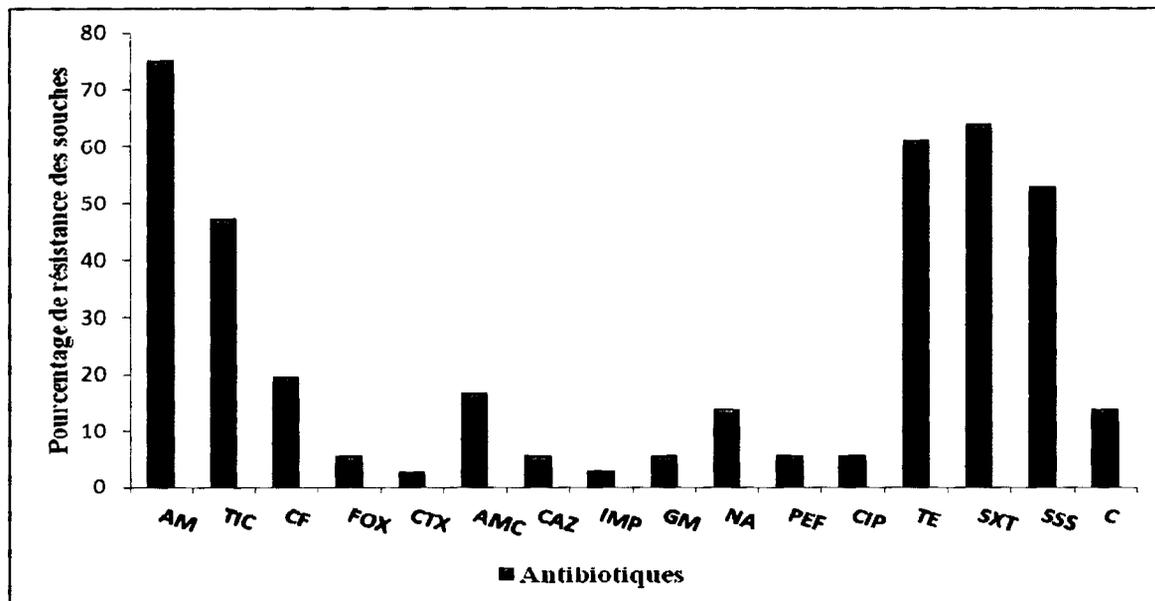


Figure 34 : Profil de résistance des pathotypes de *E.coli*

AM: ampicilline; TIC: ticarcilline; CF: céfalotine; FOX: céfoxitine; CTX: céfotaxime ; AMC: amoxicilline + acide clavulanique; CAZ: ceftazidime; IMP; imipénème; GM: gentamicine; NA: acide nalidixique; PEF: péfloxacine ; CIP: ciprofloxacine; TE: tétracycline; SXT: triméthoprim-sulfaméthoxazole; sss: sulfamides forts; C: chloramphénicol

Cette figure montre le profil de résistance des souches de *E.coli* porteurs de facteurs de virulence. Au total 36 souches de *E.coli* ont montré des résistances aux différentes classes d'antibiotiques utilisés. Les souches étaient résistantes à l'ampicilline à un taux de 75%. Il y'avait des souches qui produisaient des bêtalactamases à spectre élargi. Les souches étaient résistantes aux céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations. Une souche était résistante à l'imipénème mais restait sensible aux bêtalactamines (sauf à l'ampicilline) et aux quinolones. Six souches étaient résistantes aux quinolones représentant un pourcentage de 17%.

14. Caractérisation moléculaire

14.1. Les gènes de résistance

Les gènes de résistance ont été recherchés selon les profils de résistance des souches aux antibiotiques. Les études ont porté essentiellement sur la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques des souches de *Shigella*, *Salmonella* et de *Escherichia coli* porteurs de

Résultats

facteurs de virulence. Ce sont les principales bactéries responsables de diarrhée. Des gènes de résistance aux bêtalactamines ont été retrouvés principalement chez des souches de *Shigella* avec la présence des gènes *bla_{tem1}* sur 18 souches, le gène *bla_{oxa30}* sur 10 souches. Le gène *cat* codant la résistance au chloramphénicol a été retrouvé sur 3 souches. Les gènes *bla_{CTXM1}*, *bla_{CTXM2}* et *bla_{CTXM9}* codant la résistance aux céphalosporines ont été retrouvés sur 6 souches de *Shigella flexneri*. Le gène *tetB* codant la résistance à la tétracycline a été retrouvé chez 8 souches de *Shigella* cependant, il n'a pas été retrouvé chez *Salmonella* car toutes les souches étaient sensibles à la tétracycline. Des gènes de résistance aux quinolones ont été retrouvés chez 37 souches de *Escherichia coli*, 5 souches de *Salmonella* et 1 souche de *Shigella flexneri* résistantes à l'acide nalidixique. Le gène *gyrA* a été retrouvé chez 16 souches de *Escherichia coli* et chez la souche de *Shigella flexneri* résistante à l'acide nalidixique. Par contre le gène *gyrB* a été le plus retrouvé ; chez 26 souches de *Escherichia coli*, chez la souche de *Shigella flexneri* et les cinq souches de *Salmonella* résistantes aux quinolones. Les gènes *parC* et *parE* ont été retrouvés aussi bien chez les souches de *Escherichia coli* que chez toutes les souches de *Salmonella* et *Shigella* résistantes aux quinolones. Les gènes *gyr* et *par* retrouvés chez *Shigella* et *Salmonella* ont été clonés et séquencés. Les résultats ont montré qu'il y'avait uniquement une mutation au niveau du gène *gyrA* retrouvé chez la souche de *Shigella flexneri*. Cette mutation se résolvait par une substitution à la position 87 d'Asp87 à Thr87. Il n'y avait pas de mutation au niveau du gène *gyrB* et des gènes *par*.

Outre la technique d'amplification génique, le PFGE a été appliqué sur les cinq souches de *Salmonella* résistantes à l'acide nalidixique. Les résultats du PFGE ont montré que les 3 souches de *Salmonella* Enteritidis avaient le même profil génétique. Le gène *aac(6)-Ib* a été retrouvé chez la souche de *Shigella flexneri* et chez 22 *Escherichia coli*. Les gènes *qnr* (*qnrB* et *qnrS*) et *qep* qui sont des gènes de résistance plasmidique ont été uniquement retrouvés chez *Escherichia coli* tandis que le gène *qep* n'a été retrouvé que chez 4 souches. le gène *qnrA* n'a pas été retrouvé.

Résultats

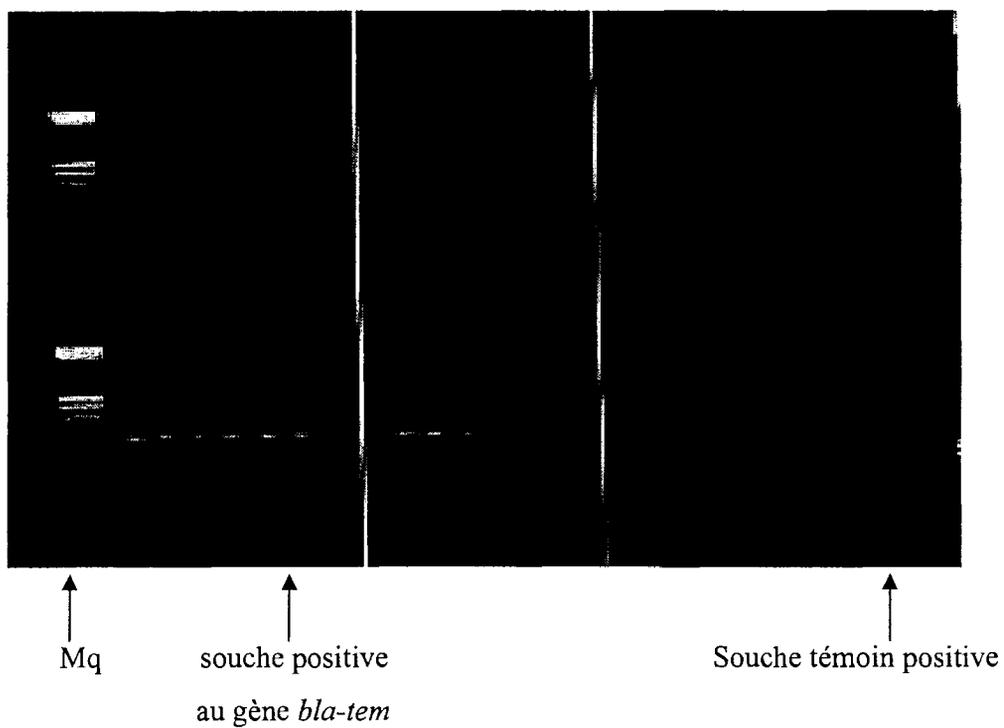


Figure 35: Photo de gel du gène *bla_{tem1}* chez des souches de *Shigella*

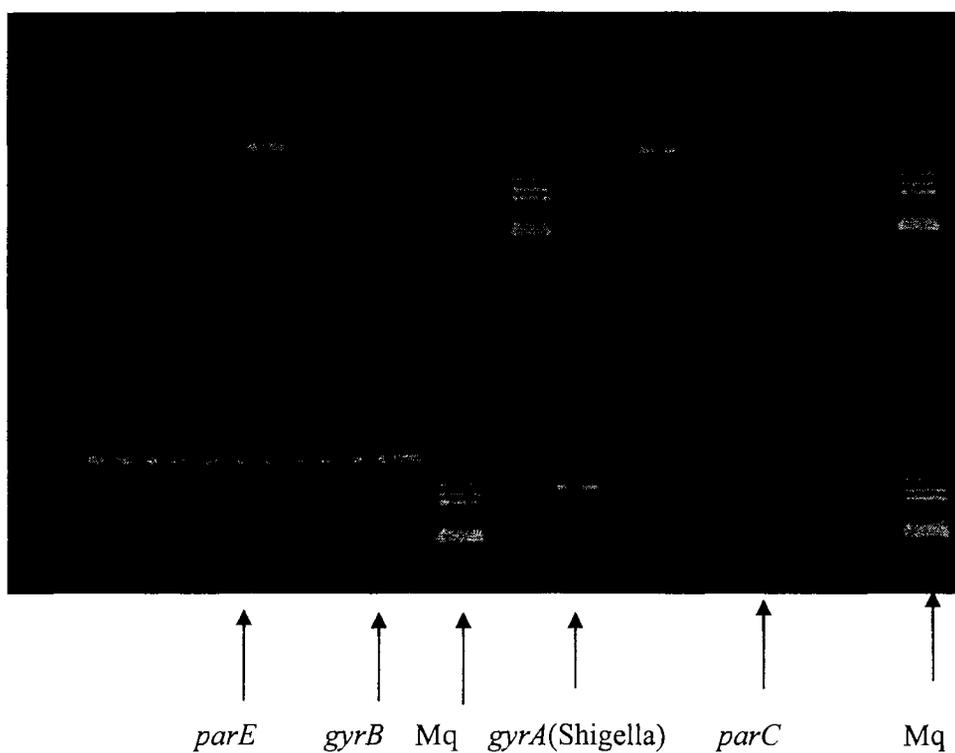


Figure 36: Photo de gel des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* souches *Salmonella* et *Shigella* NaIR

Résultats

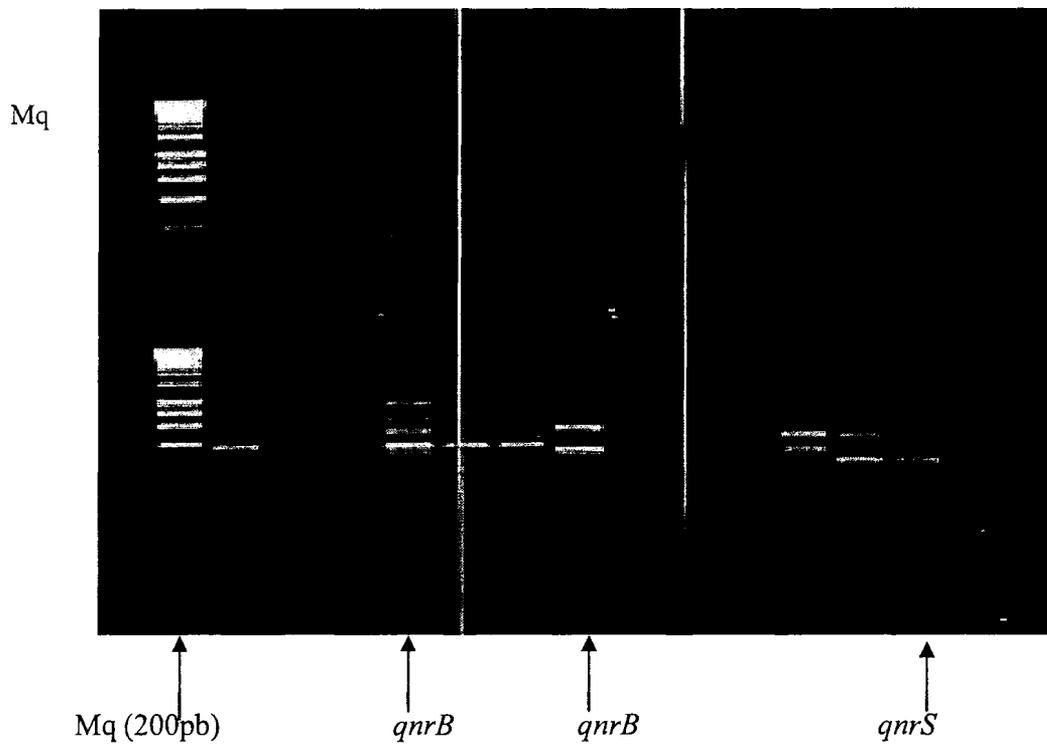


Figure 37: Photo de gel de gènes *qnrA*, *qnrB* et *qnrS*

Tableau XI : Répartition des gènes de résistance aux quinolones selon les souches

Souches	Nombre	Gènes de résistance								
		<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6)-IB</i>
<i>Shigella flexneri</i>	N=1	+	+	+	+					+
<i>Salmonella</i> Hillingdon	N=1		+	+	+					
<i>Salmonella</i> Enteritidis	N=5		+	+	+					
	N=16	+	+	+	+		+	+		+
<i>Escherichia coli</i>	N=8		+	+	+					
	N=7		+	+	+		+			
	N=4								+	
	N=3		+	+	+		+	+		

+ = présence du gène

14.2. Les intégrons

Les intégrons ont été retrouvés principalement chez des souches de *Shigella*, de *E.coli* et de *Salmonella* résistantes. Huit souches de *Shigella flexneri* et 8 souches de *E.coli* hébergeaient un intégron de classe 1, de même que 3 souches de *Salmonella* Enteritidis et une souche de *Aeromonas sobria*. La région 3' de l'intégron de classe 1 était présente uniquement chez une souche de *Shigella flexneri* et chez la souche de *Aeromonas sobria*. Ces deux souches et les souches de *E.coli* avaient également des cassettes qui renfermaient des gènes de résistance. Alors que chez les souches de *Salmonella*, l'intégron de classe 1 retrouvé est un intégron défectif qui comprenait l'intégrase *intI* et une ébauche de la région 3' conservée. Pour les souches de *Salmonella*, les résultats du PFGE ont montré qu'elles avaient le même profil génétique et en séquençant tout l'intégron le résultat a bien montré que c'est un intégron défectif. Les souches de *E. coli* ayant l'intégron de classe 1 étaient toutes résistantes aux quinolones.

Les intégrons de classe 2 ont été retrouvés chez quatre souches de *Shigella sonnei*, deux souches de *Shigella flexneri*, une souche de *Shigella dysenteriae* A2 et une souche de *Shigella boydii*. Chez *Salmonella*, l'intégron de classe 2 a été retrouvé chez les 3 souches de *Salmonella* Enteritidis qui portaient aussi l'intégron de classe 1. L'intégron de classe 2 était également présent chez une souche de *E.coli* qui portait le gène *aadA2* avec une taille de 590pb. Une seule souche de *Shigella flexneri* avait des gènes *aadA2*, *sat2* et avait un intégron de classe 2 de taille 1kb.

Nous n'avons pas retrouvé d'intégron de classe 3 chez les différentes bactéries entéropathogènes.

Les bactéries pathogènes non spécifiques ne portaient aucun intégron.

Résultats

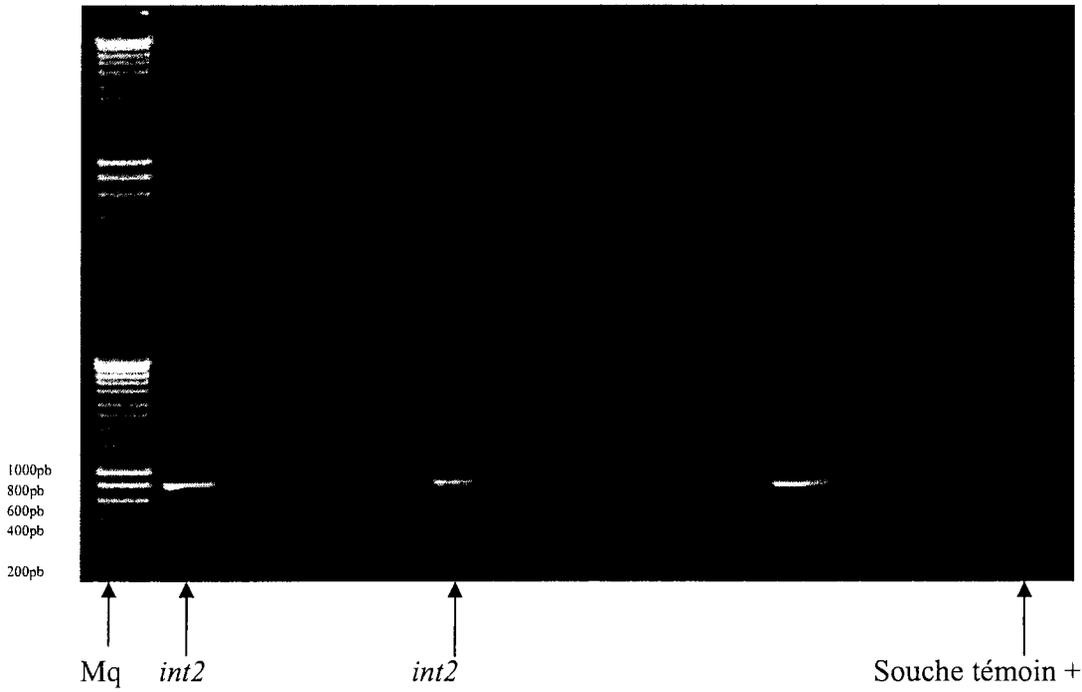


Figure 38: Photo de gel de la PCR *int2* de la souche *E.coli* NaIR

V. Discussion

Spectromètre de masse Maldi-Tof

Cette étude fournit une analyse par le MALDI-TOF du microbiote intestinal de sujets sains et de sujets diarrhéiques sénégalais. La spectrométrie de masse MALDI-TOF couplée avec la culturomics a permis l'identification d'une grande collection d'espèces bactériennes à partir d'échantillons du Sénégal et a permis la comparaison préliminaire entre le microbiote bactérien des personnes avec et sans diarrhée. Cette technique a permis d'identifier avec précision un large panel de bactéries anaérobies qui sont généralement mal identifiées par les méthodes phénotypiques actuelles (Seng 2009). Pour plusieurs espèces bactériennes, leur identification première a échoué en raison de leur absence ou de la faible représentation dans la base de données utilisée. Cependant, l'accroissement continu de la base de données avec de nouveaux spectres a résolu ces problèmes et amélioré l'identification bactérienne. Par ailleurs, l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF montre l'émergence de bactéries rares qui étaient auparavant difficiles à identifier par des méthodes phénotypiques (Fernandez-Olmos 2012; Seng 2013). Dans l'ensemble, le pourcentage d'isolats du Sénégal correctement identifiés au genre et à l'espèce par spectrométrie de masse (98,2%) est presque le même que ceux (95,4%) observés dans la première étude à grande échelle réalisée sur deux selles provenant du Sénégal, qui a utilisé la spectrométrie de masse à Marseille, France (Seng 2009). Les deux études ont été réalisées en utilisant la même base de données. Cette étude nous a permis de tester une grande collection de souches isolées à partir de peuple sénégalais plus particulièrement de population de la région dakaroise. Seules 3 espèces bactériennes, *Clostridium senegalense*, *Bacillus casamancensis* et *Clostridium dakarense*, ont été jusqu'à présent identifiées seulement au Sénégal. Cela confirme le fort potentiel de culturomic permettant d'observer de nouvelles espèces bactériennes associées à l'homme (Lagier 2012; Mishra 2012). L'augmentation de la base de données avec des bactéries a permis l'amélioration de leur identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ainsi, la base de données actuelle semble précise pour l'identification des bactéries au Sénégal. Ce travail a permis d'identifier 166 espèces de bactéries déjà présentes dans l'intestin humain, 11 espèces précédemment détectées chez l'homme, mais pas dans l'intestin, 10 espèces détectées pour la première fois chez l'homme et 2 espèces inconnues. La constitution de la flore intestinale est complexe (Gill 2006). Des techniques de culturomics récentes utilisant de très grandes conditions de culture effectuées sur les selles de 2 sénégalais sains, d'une personne obèse, d'un malade atteint de tuberculose, et d'un patient souffrant d'anorexie mentale ont permis d'identifier jusqu'à 99, 219, 192, 39, et 133 espèces

Discussion

bactériennes différentes dans les fèces, respectivement (Lagier 2012). Même si la conservation et le transport des matières fécales n'étaient pas optimaux et beaucoup moins de conditions de culture ont été utilisées, notre étude montre une modification du microbiote intestinal avec plusieurs différences significatives entre les espèces bactériennes identifiées chez les personnes souffrant de diarrhée et ceux sans. Les principales espèces bactériennes commensales telles que *E. coli* étaient significativement diminuées ainsi que plusieurs *Enterococcus* spp (*E. faecium* et *E. casseliflavus*) et anaérobies comme *Bacteroides* spp (*B. uniformis* et *B. vulgatus*) et *Clostridium* spp (*C. bifermentans*, *C. orbiscindens*, *C. perfringens* et *C. symbiosium*) chez les personnes souffrant de diarrhée. Inversement, plusieurs *Bacillus* spp (*B. licheniformis*, *B. mojavensis* et *B. pumilus*) étaient significativement plus fréquentes chez les patients souffrant de diarrhée. Par ailleurs, la diversité des espèces de *Bacillus* identifiées est plus élevée chez les patients atteints de diarrhée (Seng 2010) que ceux sans (Lee 2011), mais la différence n'est pas significative ($p = 0,055$). Dans l'ensemble, une diminution des anaérobies de la flore intestinale, principalement les Bacteroidetes, a déjà été signalée au cours d'une gastro-entérite en utilisant à la fois la culture et des méthodes moléculaires (Balamurugan 2008). Nos données montrent la survenue d'un déséquilibre de la flore bactérienne naturelle chez les patients souffrant de diarrhée. Une étude récente du microbiote intestinal africain caractérisé par le pyroséquençage de la région v5-v6 dans une population d'enfants au Burkina Faso a montré que le phylum Bacteroidetes était beaucoup plus représenté que les autres phylums 57,7% (De Filippo 2010). Le phylum des Bacteroidetes est connu pour avoir une grande variabilité inter-individuelle et géographique et peut varier selon l'adiposité (Ley 2006). Il n'est pas surprenant que le microbiote digestif chez les personnes sénégalaises soit significativement différent de celui de la population de Boulpon (Burkina Faso), car ces deux communautés ont des modes de vie différents, parce que nos échantillons ont été recrutés dans la région de Dakar alors que le travail réalisé au Burkina Faso concernait un village. Les différences dans les habitudes alimentaires pourraient expliquer les différences dans la composition du microbiote digestif. Les Bacteroidetes et les membres d'Actinobacteria qui sont des bactéries anaérobies strictes, en particulier la croissance de ces bactéries nécessitent des conditions et des milieux spécifiques. Peut-être que dans cette étude, nous n'avons pas rempli toutes les conditions pour pouvoir faire pousser ces types de bactéries. Pour ce faire, il était nécessaire pour nous d'optimiser les conditions de culture et les selles ont été inoculées d'abord dans des flacons d'hémoculture en anaérobiose pendant 48 heures ou 7 jours avant d'êtreensemencées sur des milieux de culture appropriés et incubés dans des conditions d'anaérobiose. Ces améliorations nous ont permis

Discussion

d'identifier *Colinsella aerofaciens* dans 20 selles et des espèces du genre *Bacteroides*. Le phylum Actinobacteria était représenté par *Eggerthella lenta* espèce retrouvée chez les nourrissons (0 à 5 ans). Dans d'autres études, il a été montré que Actinobacteria était prédominant chez les enfants du Burkina Faso que chez les enfants occidentaux par exemple. Un certain nombre d'études ont révélé que des relations particulières existent entre le microbiote intestinal et la santé humaine, l'alimentation et l'âge (Vrieze 2010). Il a été décrit qu'une perturbation de la flore commensale augmente la susceptibilité aux infections entériques. La richesse microbienne intestinale pourrait avoir des effets sur la santé liés à plusieurs facteurs. Des entérobactéries telles que *Salmonella*, *Enterobacter* qui ont été incriminées comme microbes potentiellement pathogènes intestinaux provoquant une diarrhée étaient représentées chez les sujets diarrhéiques. Nos résultats suggèrent que l'assainissement, l'hygiène, la géographie et le climat ont joué un rôle majeur dans la diversité microbienne. L'effet de l'alimentation sur la composition du microbiote du nourrisson n'est pas clair; de nombreuses études rapportent une plus faible abondance de bifidobactéries dans la microflore. Dans notre étude, nous n'avons pas de bifidobactéries dans le groupe nourrisson. La similitude de la composition du microbiote des enfants et des adultes au Sénégal montre que les enfants ont la même nourriture que les adultes. Les enfants à 1 an commencent à être alimentés comme les adultes alors que de la naissance jusqu'à deux ans, Jusqu'au sevrage, sa nourriture principale devrait être l'allaitement maternel et l'introduction précoce d'aliments à base de riz, de poisson et de légumes et rarement de la viande ou des œufs. Aussi les conditions d'hygiène déplorables, les enfants jouent sur le terrain et sont exposés aux maladies du péril fécal. Des maladies telles que la diarrhée qui affecte ce groupe d'âge sont dus à la voie fécale-orale.

Cette partie du travail a fait l'objet de publications:

Article 1: Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs (PLoS ONE 01/2012; 7(6):e39495. DOI:10.1371). Marie Kempf¹, Jean-Marc Rolain¹, Georges Diatta², Saïd Azza¹, Bissoum Samb³, Oleg Mediannikov¹, Amy Gassama Sow³, Seydina M. Diene¹, Florence Fenollar¹, Didier Raoult¹
1: Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), UMR CNRS-6236, Aix Marseille Université , Marseille, France, 2: Institut de Recherche pour le Développement, URMITE, Dakar, Sénégal, 3: Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur Dakar, Sénégal.

Discussion

Article 2: Molecular diversity of the Planctomycetes in the human gut microbiota in France and Senegal (APMIS. 2013 Apr 18. doi: 10.1111/apm.12087).

Caroline Cayroul, Bissoume Sambel, Armougom F, Didier Raoult¹, Michel Drancourt¹
Aix Marseille Université, URMITE, UMR CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Marseille, France.

Article 3: Non contiguous-finished genome sequence and description of *Clostridium dakarensis* spp. nov. (Standards in Genomic Sciences 08/2013; DOI:10.4056/sigs.4097825).

Cheikh Ibrahima Lo¹, Ajay Kumar Mishra¹, Roshan Padhmanabhan¹, Bissoume Samb Ba², Amy Gassama Sow², Catherine Robert¹, Carine Couderc¹, Ngor Faye³, Didier Raoult¹, Pierre-Edouard Fournier¹, and Florence Fenollar¹

1: Aix-Marseille Université, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), Marseille, France

2: Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar 36, Dakar, Senegal

3: Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Laboratoire de Parasitologie générale, Fann (Senegal)

Article 4: MALDI-TOF identification of human gut microbiome of people with and without diarrhea – Senegal (**soumis à PlosOne**).

Bissoume Samb-Ba^{1,2}, Catherine Mazenot¹, Amy Gassama Sow², Grégory Dubourg¹, Hervé Richet¹, Perrine Hugon¹, Jean-Christophe Lagier¹, Didier Raoult¹, Florence Fenollar¹

¹Aix-Marseille Université, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, 13005 Marseille, France and Dakar, Senegal.

²Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar 36, avenue Pasteur BP 220 Dakar, Senegal.

Carbapenem Resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: The Paradigm of a Common Phenomenon in Natural Reservoirs

Marie Kempf¹, Jean-Marc Rolain¹, Georges Diatta², Saïd Azza¹, Bissoum Samb³, Oleg Mediannikov¹, Amy Gassama Sow³, Seydina M. Diene¹, Florence Fenollar¹, Didier Raoult^{1*}

1 Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), UMR CNRS-6236, Aix Marseille Université, Marseille, France, **2** Institut de Recherche pour le Développement, URMITE, Dakar, Sénégal, **3** Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur, Dakar, Sénégal

Abstract

Incidence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is rising in several parts of the world. In Africa, data concerning this species and its resistance to carbapenems are limited. The objective of the present study was to identify the presence of *A. baumannii* carbapenem-resistant encoding genes in natural reservoirs in Senegal, where antibiotic pressure is believed to be low. From October 2010 to January 2011, 354 human head lice, 717 human fecal samples and 118 animal fecal samples were screened for the presence of *A. baumannii* by real time PCR targeting *bla*_{OXA51-like} gene. For all samples positive for *A. baumannii*, the carbapenemase-hydrolysing oxacillinases *bla*_{OXA23-like} and *bla*_{OXA24-like} were searched for and sequenced, and the isolates harbouring an oxacillinase were genotyped using PCR amplification and sequencing of *recA* gene. The presence of *A. baumannii* was detected in 4.0% of the head lice, in 5.4% of the human stool samples and in 5.1% of the animal stool samples tested. No *bla*_{OXA24} gene was detected but six fecal samples and three lice were positive for *bla*_{OXA23-like} gene. The *bla*_{OXA23-like} gene isolated in lice was likely a new oxacillinase sequence. Finally, the *A. baumannii* detected in stools were all of *recA* genotype 3 and those detected in lice, of *recA* genotype 4. This study shows for the first time a reservoir of *bla*_{OXA23-like} positive gene in human head lice and stool samples in Senegal.

Citation: Kempf M, Rolain J-M, Diatta G, Azza S, Samb B, et al. (2012) Carbapenem Resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: The Paradigm of a Common Phenomenon in Natural Reservoirs. PLoS ONE 7(6): e39495. doi:10.1371/journal.pone.0039495

Editor: Markus M. Heimesaat, Charité, Campus Benjamin Franklin, Germany

Received: February 10, 2012; **Accepted:** May 22, 2012; **Published:** June 20, 2012

Copyright: © 2012 Kempf et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: These authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: didier.raoult@gmail.com

Introduction

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative coccobacillus that has emerged over the last few decades as a cause of both healthcare-associated and community-acquired infections [1,2]. This bacterium is an important nosocomial pathogen of critically ill patients that can cause a wide range of infections, including ventilator-associated pneumonia, bloodstream infections, wound infections and nosocomial meningitis [1,3,4]. While *A. baumannii* is isolated from patients and hospital environment sources during outbreaks, the reservoir outside hospitals is not well delineated. This species can be isolated from human skin (between 0.5% and 3% according to the study), animal feces, water, soil or vegetables [5–8], but taken together, current data indicate that occurrence of *A. baumannii* in the environment is not well characterized [9]. The bacterium has also been isolated from human head and body lice as previously described [10].

Acquired resistance of *A. baumannii* to carbapenems has increasingly been reported all over the world during the last decade [2,11,12]. Until recently, antibiotic consumption has been pointed out as principal causative agent in acquisition of resistance genes [13]. However, this concept has been challenged since it has been discovered in 2011 a highly diverse collection of genes encoding resistance to beta-lactam, tetracycline and glycopeptide antibiotics in an authenticated ancient DNA from 30,000-year-old

Beringian permafrost sediments [14]. This discovery has shown that there are reservoirs of resistance determinants that can be mobilized into the microbial community. Thus, although antibiotic resistance has long been considered as a modern phenomenon, it predates the concept of selective antibiotic pressure due to clinical antibiotic usage [14,15].

To eventually confirm this paradigm, the objective of our study was to detect and to identify the presence of *A. baumannii* and carbapenem resistant encoding genes in natural environments in Senegal, i.e. in head lice and feces from people and pets living in different rural areas, where antibiotic pressure is believed to be low.

Results

Detection of *A. baumannii*

Head lice. From October 2010 to January 2011, 354 head lice collected from 128 women and girls (10 adults and 118 children) were analyzed and included in this study. A geographical repartition of women whose head lice were collected is presented in Figure 1. All the head lice collected were black. *A. baumannii* was detected by PCR targeting *bla*_{OXA51-like} gene in 14 head lice (4.0%) collected from 6 women (4.0%). Among these positive lice, 5 were collected in Keur Massar (12.5% of the lice collected in Keur

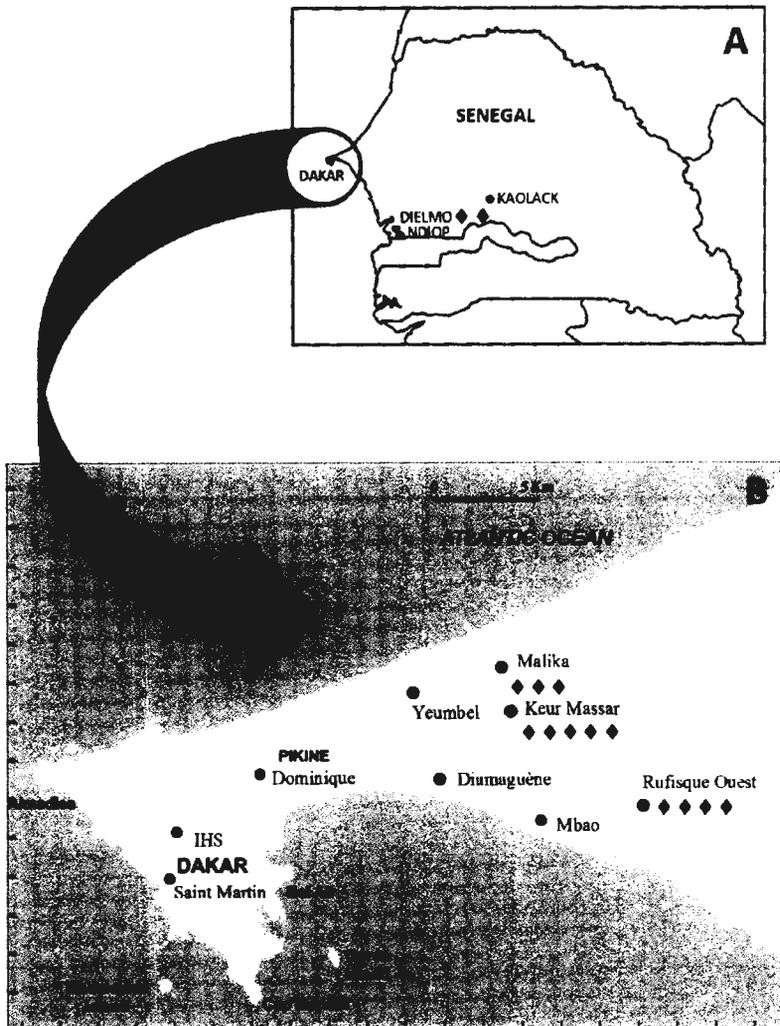


Figure 1. Head lice collection in Senegal. *A*: Head lice collection areas (Dakar, Kaolack, Sine-Saloum, Dielmo and Ndiop). *B*: Head lice collection sites in the suburbs of the Dakar region. Diamonds: number of lice positive for *A. baumannii*; green diamonds: *A. baumannii* negative for the *bla*_{OXA23}-like gene; red diamonds: *A. baumannii* positive for the *bla*_{OXA23}-like gene. doi:10.1371/journal.pone.0039495.g001

Massar), 4 in Rufisque (7.5%), 3 in Malika (5.3%), and 2 in Dielmo (10.0%).

Human stool samples. The number of human stool samples tested by PCR targeting *bla*_{OXA51}-like gene for the presence of *A. baumannii* was 150 in 2008, 496 in 2009, 20 in 2010 and 51 in 2011 (Table 1). Among them, 39 were positive by PCR for *A. baumannii* (5.4%): 9 in 2008, 27 in 2009, 1 in 2010 and 2 in 2011. The majority of the positive stool samples were collected in Dielmo (29 samples). For 2011, cultivation of the 51 fresh stool specimens allowed identification of *A. baumannii* by MALDI-TOF MS in two samples, those who were positive by PCR for *A. baumannii*. Antibiotic susceptibility testing was performed, and both strains were found to be resistant to imipenem (MICs>8 confirmed using the E test). The strains were isolated from the stools of a man and a woman living in Mbao. These two isolates were also resistant to all of the other antibiotics tested, except colistin and rifampin.

Animal stool samples. The presence of *A. baumannii* was searched by cultivation in stool samples from 11 donkeys, 22 cows,

9 ducks, 19 goats, 42 chickens, 8 sheep, 6 pigeons and one dog. The bacterium was isolated in seven samples (3 goats, 1 duck, 1 pigeon, 1 donkey and 1 chicken).

Detection of the Carbapenemase-hydrolyzing Oxacillinases

All of the *bla*_{OXA-51}-like-positive samples (14 head lice, 39 human and 7 animal stool samples) were checked for the presence of carbapenemase-encoding genes using PCR methods. No sample was positive for the *bla*_{OXA24}-like gene, but PCR targeting *bla*_{OXA23}-like-gene was positive for 3 head lice and in 6 human stools. No animal stool sample was positive for either *bla*_{OXA}-like gene. The head lice came all from Rufisque Ouest, and the stool samples were collected in Ndiop (four samples) and Mbao (two samples). The *bla*_{OXA23}-like gene from these samples was sequenced, and the nucleotide sequences were compared to the GenBank database using BLASTN. Of the six stool samples, all presented 100% of similarity with GenBank accession no. AJ132105. Of the three lice

Table 1. Repartition of stool samples and *A. baumannii*-positive stool samples.

Number of stool samples (ss) collected	Men/women/not known	Children/adults/not known	Number of detected <i>A. baumannii</i> (locations)	<i>bla</i> _{OX_A23-like} -positive <i>A. baumannii</i>
Year 2008 : 150 ss				
Dielmo: 73 ss	71/79/0	150/0/0	9 (Dielmo)	0
Ndiop: 77 ss				
Year 2009 : 496 ss				
Dielmo: 232 ss				
Ndiop: 258 ss	222/256/18	246/222/28	27 (Dielmo: 20; Ndiop: 7)	4 (Ndiop)
Dakar: 4 ss				
Nhiakar: 2 ss				
Year 2010 : 20 ss				
Dielmo: 20 ss	11/9/0	11/6/3	1 (Dielmo)	0
Year 2011 : 51 ss				
Mbao: 28 ss				
Dominique-Pikine: 7 ss	28/23/0	22/29/0	2 (Mbao)	2 (Mbao)
Roi Baudoin: 6 ss				
IHS: 4 ss				
Saint Martin: 6 ss				

doi:10.1371/journal.pone.0039495.t001

samples, partial nucleotide sequences of the *bla*_{OX_A23-like} gene were obtained that were 100% identical to each other and presented 100% of similarity with *bla*_{OX_A23-like} sequences recently reported from groundwater samples coming from the Katmandu Valley of Nepal (GenBank accession no. AB636089). The partial translated protein sequences showed four differences in amino acid composition at positions 4, 41, 44 and 48 (Figure 2), leading to a probable new variant of *bla*_{OX_A23-like} gene closely related to *bla*_{OX_A134} gene from *A. radioresistens* (Figure 3). These three sequences have been deposited in Genbank under the submission ID 1538144. Unfortunately, we were not able to obtain the full sequence of this gene despite several attempts. The *bla*_{OX_A51-like} gene from the two carbapenem-resistant *A. baumannii* isolated by culture in stools were also sequenced and are also presented in Figure 3. Finally, PFGE and southern blot analysis of the *bla*_{OX_A23-like} gene found in the two *A. baumannii* strains isolated in the stool samples likely suggest that the gene was chromosomally encoded (Figure 4).

A. baumannii recA Genotyping

The nine samples positive for the *bla*_{OX_A23-like} gene were also sequenced for *recA* gene. Amplifying the *recA* gene allowed unambiguous determination of the sequence of a 336-base pair fragment. Concerning the three lice samples, all were of genotype 4 (GenBank accession no. AY274829)(11). The stool samples were all of genotype 3 (GenBank accession no. AY274828). Some samples negative for the *bla*_{OX_A23-like} gene were also sequenced for the *recA* gene and results showed that they were mostly of genotype 1 (GenBank accession no. AY274826).

Discussion

In our work, we have shown that 4.0% of the head lice studied were positive for *A. baumannii* (14/354). The head lice being transported in alcohol, direct identification by culture could not be performed. Thus, the bacteria were detected by molecular methods only from head lice extracts with primers specific for

*bla*_{OX_A51-like} gene. *A. baumannii* has previously been found in body lice collected from different European countries, from sub-Saharan African countries and from the South American continent [10], but the presence of the bacterium in lice in Senegal has not been highlighted. We have also shown that 5.4% of the human stool samples and 6.0% of the animal stool samples studied were positive for *A. baumannii*. Presence of *A. baumannii* in stool samples has already been shown in individuals from the community in European countries [8] but to our knowledge, environmental studies in Africa searching for the bacteria have never been performed. Our study confirmed that *A. baumannii* is not exclusively a hospital pathogen but also a nationwide human and animal colonizer.

Detection of carbapenemase encoding genes was performed on all the *bla*_{OX_A51-like} gene positive samples and results showed that 21.4% of the head lice (3/14) harbored a *bla*_{OX_A23-like} gene sequence. We believe that these sequences belong to *A. baumannii* species because, to the best of our knowledge, only *A. baumannii* species has been detected in human body lice to date. Sequencing of this gene allowed discovering a putative new variant but unfortunately we were unable to obtain the full sequence of this gene. Interestingly, our sequence was 100% identical to *bla*_{OX_A23-like} partial sequences found recently by Tanaka *et al.* in groundwater samples coming from the Katmandu Valley of Nepal, showing presence of multi-drug resistant *Acinetobacter* in different environments in the world [16]. These sequences are closely related to *bla*_{OX_A134} gene from *A. radioresistens* (Figure 3). Carbapenem-resistance encoding gene sequences have never been detected previously in human lice. Until now, the *A. baumannii* isolates detected in human lice were remarkably susceptible to antibiotics, particularly to carbapenems [10], as shown by the sequenced SDF strain isolated from a human body louse. Analysis of its genome showed a remarkably susceptible strain that harbored several hundred of Insertion Sequence elements [17] that might play a role in the acquisition of carbapenem-resistant genes in *A. baumannii*. Thus, it would be necessary, in future

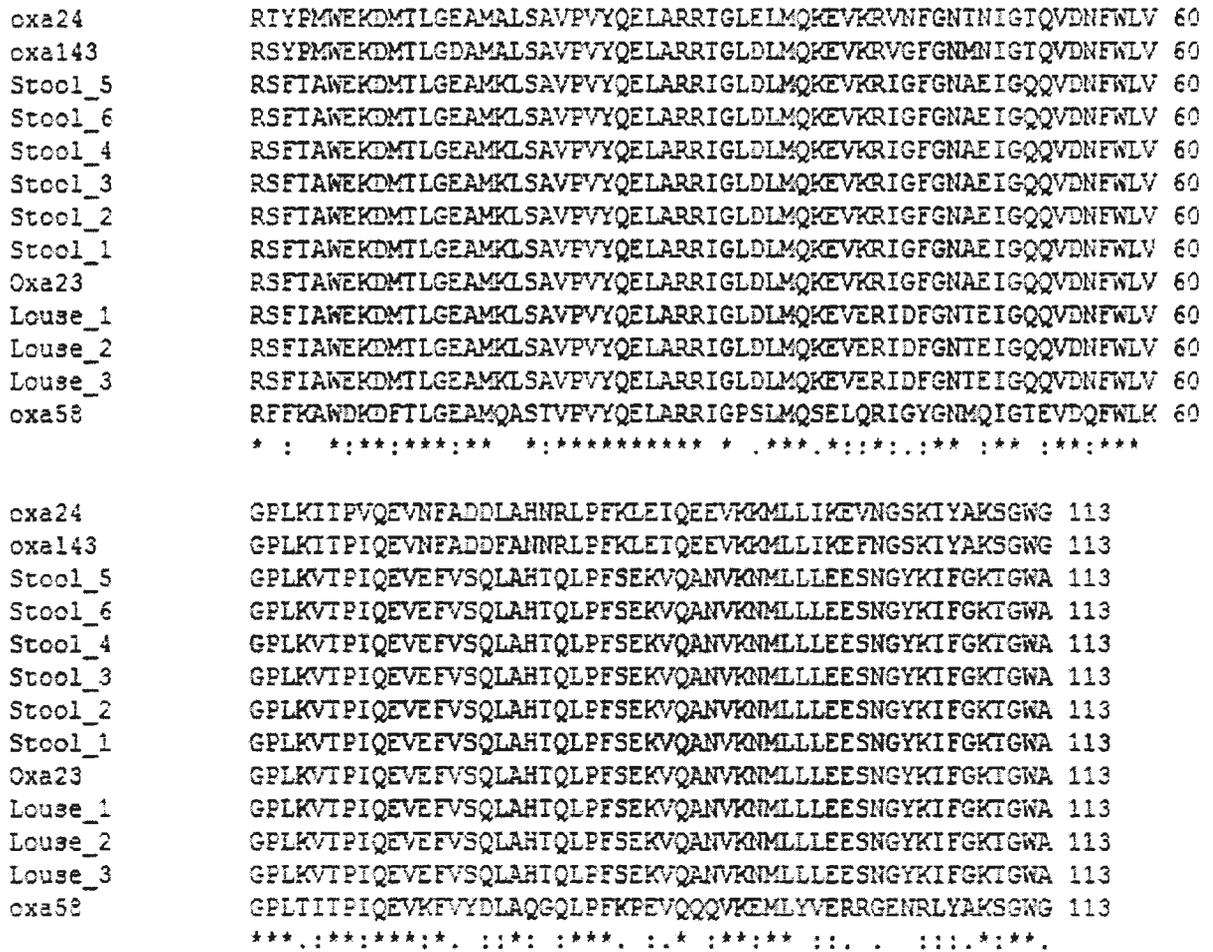
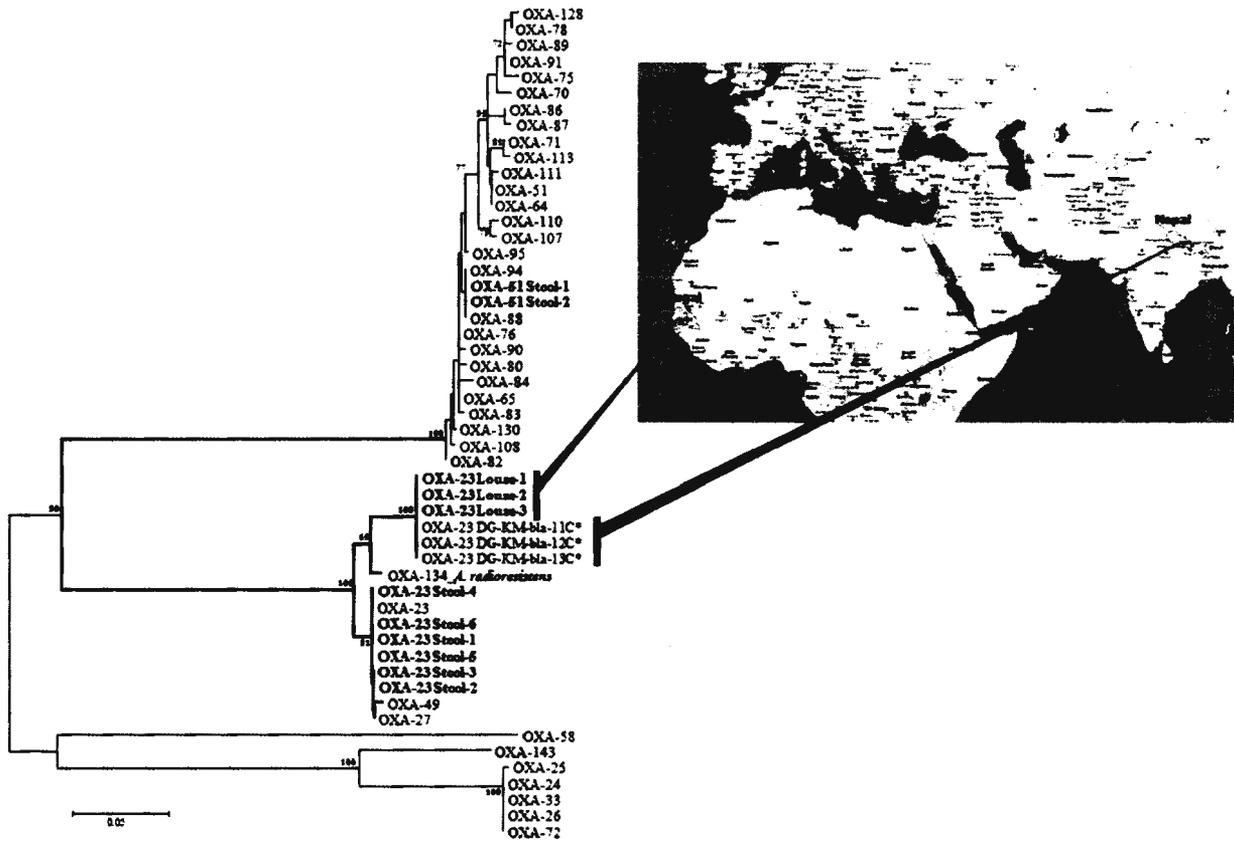


Figure 2. CLUSTAL W2 nucleotide alignment of the three *bla*_{OXA23-like}-positive *A. baumannii* found in lice (indicated louse 1 to 3) and of the six *bla*_{OXA23-like}-positive *A. baumannii* found in human stool samples (indicated stool 1 to 6). The *bla*_{OXA23-like} gene AJ132105 was taken as reference.
doi:10.1371/journal.pone.0039495.g002

studies, to cultivate the samples in order to isolate the bacteria and to fully characterize this carbapenemase encoding gene.

Besides, our study was the first to show the presence of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates in human stool samples in Senegal. Carbapenem resistance, which has been detected by antimicrobial susceptibility testing, was associated with resistance to all of the beta-lactams and to most of the antibiotics tested. Resistance to carbapenems has been characterized at the molecular level with specific primers targeting two oxacillinase genes and here, *bla*_{OXA-23-like} was detected. Multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* strains producing oxacillinase enzymes have been reported worldwide, especially in nosocomial outbreaks [1,2,18,19]. These facts have been evidenced by the large number of studies published [1,2,20]. However, concerning the epidemiology of MDR *A. baumannii* in African countries, only a few studies have been performed. MDR strains have been isolated in Tunisia [21], Algeria [19,22,23], Namibia and South Africa [24]. What was intriguing in our study was that carbapenemase encoding genes were detected in environmental samples where antibiotic pressure was low. Some explanation might be brought by D’Costa *et al.*, who recently discovered reservoirs of resistance determinants

in environments like permafrost sediments that were free from antibiotic contamination [14], showing that antibiotic resistance predates the concept of selective antibiotic pressure due to clinical antibiotic usage. It has also been shown that soil-dwelling bacteria produced and encountered a myriad of antibiotics, and that they are a reservoir of resistance determinants that can be mobilized into the microbial community [25]. Although there was no doubt that *bla*_{OXA23} gene was present in *A. baumannii* species for the two human stool isolates in our study, we could not exclude the possibility that samples only analyzed by PCR methods that were positive for *bla*_{OXA51} and *bla*_{OXA23} could be due to the combination of *A. baumannii* with another *Acinetobacter* spp. harboring *bla*_{OXA23}. Although *bla*_{OXA-23-like} gene was likely transferred in environment from a reservoir that is unknown here, gene transfer from the environmental bacterium *Acinetobacter radioresistens* has been previously described by Poirel *et al.* [26]. More recently, the presence of the *bla*_{OXA23-like} gene has also been detected in *Acinetobacter* genomospecies 15TU isolates found in rectal samples collected from cattles in France, suggesting potential gene exchanges [27]. Our suppositions are supported by the fact that lateral gene-transfer are common and can be important



*, 3/15 partial *bla*_{OXA-23} sequences found in Uncultured *Acinetobacter* isolated from groundwater collected from deep tube well in Nepal

Figure 3. Carbapenemase-hydrolysing oxacillinases phylogenetic tree using neighbour-joining method. *, partial *bla*_{OXA-23} sequences found in Uncultured *Acinetobacter* isolated from groundwater collected from deep tube well in Nepal. doi:10.1371/journal.pone.0039495.g003

mechanisms in genome evolution [28]. Moreover, one can question on the presence of genetic mobile elements in *A. baumannii*, that have shown to play a key role in regulatory changes [29].

Finally, the *recA* genotypes of the *A. baumannii* found in the *bla*_{OXA-23-like} -containing samples were limited to two clones. One clone was detected only in lice that were collected in Rufisque (east of Dakar), and the other one was detected only in stools that were collected in Ndiop (South of Dakar) and Mbao (east of Dakar, near Rufisque). Thus, *A. baumannii* genotypes were specific to the sample origin and not distributed geographically.

In summary, our study showed the presence of a reservoir of *A. baumannii* carbapenem-resistant isolates in human stools collected in Senegal, in places where it is unlikely that they have been selected by antibiotic prescriptions. Finally, our results question the breadth of *A. baumannii* reservoirs and the cause of the carbapenem resistance beyond antibiotic pressure.

Materials and Methods

A part of this study concerns the Dielmo project, a longitudinal prospective study initiated in 1990 for long-term investigation of host-parasite relationships [30,31].

Sample Collection

Head lice were collected from October 2010 to January 2011, from women with no clinical symptoms from different locations in Senegal (Figure 1). Lice collected in Ndiop were preserved in alcohol; the others were kept in dry tubes. All of them were transferred to Marseille (France) at room temperature. The human stool samples included in this study were collected from 2008 to 2010 in Dielmo and Ndiop, Senegal, from healthy persons, as previously described [32], and mixed with 2.5 mL of absolute ethanol for storage and transportation to Marseille at room temperature. In 2011, 51 diarrheal stool samples were also collected in Dakar (Senegal) and cultivated on Drigalski and sheep blood agar media. In addition, free stool samples were collected immediately after defecation to decrease the risk of contamination from soil by local farmers on their own domestic and wild animals in the area of Dielmo and Ndiop and cultivated. No experimentation was done on these animals. Bacterial identification at the species level was performed on each colony obtained on the culture media using the Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex, Bruker Daltonics) with the flex control software (Bruker Daltonics). A score value >1.9 was considered positive for identification at the species level, as previously reported [33].

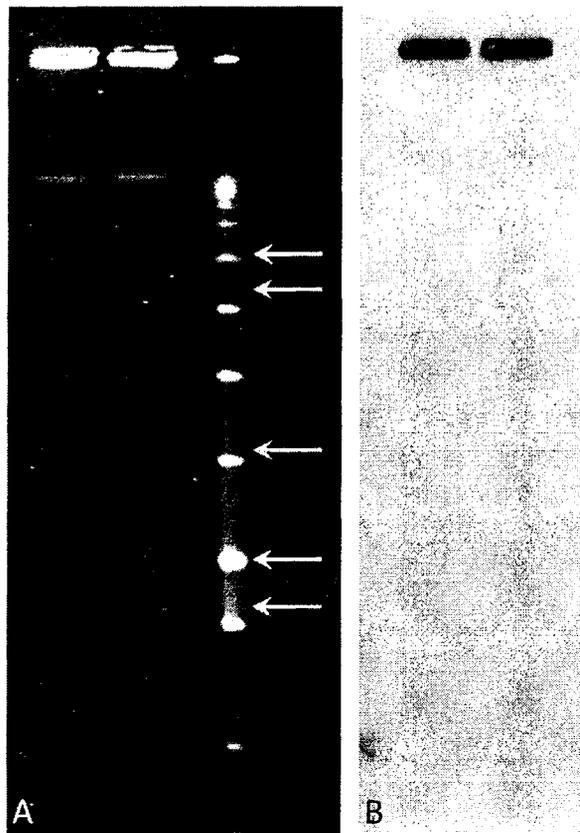


Figure 4. PFGE and hybridization analysis. **A.** Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) profiles obtained for the two *Acinetobacter baumannii* strains isolated from the stool samples from two patients living in Mbao. The Low Range PFG Marker (LRM) was used as molecular weight marker. **B.** Southern blot profile obtained for the two *Acinetobacter baumannii* strains isolated from the stool samples from two patients living in Mbao after hybridization against the *bla*_{OXA-23-like} DIG-labeled probe. Arrows indicate putative plasmids.
doi:10.1371/journal.pone.0039495.g004

Susceptibility Testing

For the *A. baumannii* strains isolated in human and animal stool samples in 2011, antibiotic susceptibility testing was performed by the disc diffusion method using a panel of 14 different antibiotics including ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, colistin and rifampicin [18]. Susceptibility breakpoints used were those recommended by EUCAST (www.euca.org). According to EUCAST breakpoints, an isolate is considered resistant or susceptible to imipenem with inhibition diameters <17 mm and ≥23 mm, respectively. For isolates with diameters <17 mm, Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) were determined using the E test method (AB Biodisk, Solna, Sweden), and resistance was defined as isolates with MIC against imipenem >8 mg/L.

Molecular Detection of Carbapenemase-hydrolyzing Oxacillinases

Genomic DNA was extracted from bacterial colonies identified as *A. baumannii* by MALDI-TOF MS, as described above. Concerning the lice, each was previously rinsed twice in sterile

water for 15 minutes. Total genomic DNA from each half louse and all stool samples collected was extracted using the BioRobot MDx workstation (QIAGEN, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's recommendations and protocols. The detection of *A. baumannii* was determined by screening the samples (lice and stool) with a real-time PCR assay targeting the *bla*_{OXA51-like} gene (Table 2). Amplification was performed using thermocycler conditions as follows: an initial denaturation step at 95°C for 15 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec and extension at 60°C for 1 min. Negative and positive controls were included in each assay. For all the samples positive for *bla*_{OXA51-like} gene, molecular detection and sequencing of the carbapenemase-encoding genes *bla*_{OXA23-like} and *bla*_{OXA24-like}, the two most common carbapenemase-encoding genes in *A. baumannii*, was performed by PCR. The presence of *bla*_{OXA50} gene was not investigated in this study. The conditions used for detection are as follows: an initial denaturation step at 95°C for 15 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, hybridization at 57°C for 30 sec and extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. (Table 2). Finally, the *bla*_{OXA51-like} gene was sequenced for carbapenem-resistant *A. baumannii* isolated by cultivation.

A. baumannii recA Genotyping

For samples positive for carbapenemase-hydrolyzing oxacillinases, the *recA* gene was amplified and sequenced using specific primers as previously described [10] (Table 2). Some negative samples were also selected for *recA* genotype determination. Genotypes were determined by comparing *recA* sequences with the genotypes deposited in the GenBank database.

Carbapenemase-encoding Genes Analysis by PFGE and Hybridization

A. baumannii genomic DNA plugs were performed and equilibrated in 0.5×TBE (50 mM Tris, 50 mM boric acid, 1 mM EDTA). Each agarose block as well as molecular weight markers (Low Range PFG Marker and Lambda Ladder PFG Marker - Biolabs, New England) were placed in the well of a 1% PFGE agarose gel (Sigma). The pulsed field gel separation was made on a CHEF-DR II apparatus (Bio-Rad Laboratories, Inc) with pulses ranging from 2 to 20 seconds at a voltage of 5 V/cm and switch angle of 120° for 22 hours at 14°C. Gels were stained with ethidium bromide and analyzed using a Gel-Doc 2000 system (Bio-Rad Laboratories) and used to prepare Southern blots. The gel was transferred onto Hybond N+ (GE Healthcare) with the vacuum blotter (model 785, Bio-Rad) and UV cross-linked for 2 min. The blots were then hybridized against the Oxa-23 DIG-labeled probe (Table 2) as recommended by the manufacturer (DIG-System, Roche Diagnostics) except that detection of the hybridized probe was performed using a horseradish peroxidase-conjugated monoclonal Mouse Anti-Digoxin (Jackson ImmunoResearch, 1:20 000). After washings, blots were revealed by chemiluminescence assays (ECL, GE Healthcare). The resulting signal was detected on HyperfilmTM ECL (GE Healthcare) by using an automated film processor (HyperprocessorTM, GE Healthcare).

Ethic Statement

Informed verbal consents were obtained from all the participants involved in our study. This study was approved (Agreement #11-010), by the Ethic Committee of the Institut Fédératif de Recherche 48, Marseilles, France since this study was a non-interventional epidemiological research study as a part of the

Table 2. Oligonucleotide primers and TaqMan* fluorescent probe sequence used for PCR and sequencing of *Acinetobacter baumannii*.

Targets	Primer Names	Primer Sequences	Amplicon Size (bp)	References or sources
bla _{OXA51-like}	OXA51 _{like} -F	5'-AACATTAAGCACTCTACTTATAAC	171	This study
	OXA51 _{like} -R	5'-TTGTTGGATAACTAAAACACCCGT		
	OXA51 _{like} -Dye	FAM-TGCTCACCTTATATAGTGCTGCTAA-TAMRA		
bla _{OXA51-like}	OXA51 _{like} -FSeq	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	[34]
	OXA51 _{like} -RSeq	5'-TGGATTGCACCTTCATCTTGG		
bla _{OXA23-like}	OXA23 _{like} -F	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	[35]
	OXA23 _{like} -R	5'-ATTTCTGACCGCAITTCAT		
bla _{OXA24-like}	OXA24-F	5'-ATGAAAAAATTTATACTTCTTATTTCAGC	825	[36]
	OXA24-R	5'-TTAAATGATCCAGATTTTCTAGC		
recA	rA1F	5'-CCTGAATCTTCTGGTAAAC	424	[10]
	rA2R	5'-GTTTCTGGGCTGCCAACATTAC		

*Applied Biosystems, Courtaboeuf, France.
doi:10.1371/journal.pone.0039495.t002

French Bioethics law N° 2004-800 (06/08/2004). In addition, free stool samples were collected from soil by local farmers on their own domestic and wild animals in the area of Dielmo and Ndiop and cultivated and no experimentation was done on these animals.

Acknowledgments

We thank traditional Chiefs and people in the study areas, particularly Mr. Aliou Diallo and Mr. Moussa Cisse for their invaluable assistance and kind collaboration.

References

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 21: 538–582.
2. Kempf M, Rolain JM (2012) Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents 39: 105–114.
3. Kim BN, Peleg AY, Lodise TP, Lipman J, Li J, et al. (2009) Management of meningitis due to antibiotic-resistant *Acinetobacter* species. Lancet Infect Dis 9: 245–255.
4. Luna CM, Aruj PK (2007) Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. Respirology 12: 787–791.
5. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T (1999) Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18: 179–183.
6. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, et al. (1997) Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol 35: 2819–2825.
7. Berlau J, Aucken HM, Houang F, Pitt TL (1999) Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. J Hosp Infect 42: 201–204.
8. Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernards AT, et al. (2005) Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. Clin Microbiol Infect 11: 329–332.
9. Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 5: 939–951.
10. La Scola B, Raoult D (2004) *Acinetobacter baumannii* in human body louse. Emerg Infect Dis 10: 1671–1673.
11. Oteo J, Garcia-Estebanez C, Miguelanez S, Campos J, Mari S, et al. (2007) Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. J Infect 55: 260–266.
12. Rolain JM, Roch A, Castanier M, Papazian L, Raoult D (2011) *Acinetobacter baumannii* Resistant to Colistin With Impaired Virulence: A Case Report From France. J Infect Dis 204: 1146–1147.
13. Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P (2010) Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. Crit Care 14: R113.
14. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, et al. (2011) Antibiotic resistance is ancient. Nature 477: 457–461.
15. Rolain JM, Canton R, Cornaglia G (2012) Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. Clin Microbiol Infect in press.
16. Tanaka Y, Nishida K, Nakamura T, Chapagain SK, Inoue D, et al. (2012) Characterization of microbial communities distributed in the groundwater pumped from deep tube wells in the Kathmandu Valley of Nepal. J Water Health 10: 170–180.
17. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, et al. (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet 2: e7.
18. Kusradzė I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM (2011) Molecular detection of OXA-carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. Int J Antimicrob Agents 38: 164–168.
19. Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M, Djahoudi A, et al. (2012) Emergence of bla_{OXA-23} and bla_{OXA-38} carbapenemase encoding genes in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University hospital of Annaba, Algeria. Int J Antimicrob Agents in press.
20. Fournier PE, Richez H (2006) The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis 42: 692–699.
21. Mansour W, Poirel L, Bettaieb D, Bouallegue O, Boujaafar N, et al. (2008) Dissemination of OXA-23-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia. Microb Drug Resist 14: 289–292.
22. Drissi M, Poirel L, Mugnier PD, Baba AZ, Nordmann P (2010) Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 29: 1457–1458.
23. Bakour S, Kempf M, Touati A, Ait Ameur A, Haouchine D, et al. (2012) Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two University Hospitals in Algeria. J Med Microbiol in press.
24. Bertrand X, Dowzicky MJ (2012) Antimicrobial susceptibility among gram-negative isolates collected from intensive care units in North America, Europe, the Asia-Pacific Rim, Latin America, the Middle East, and Africa between 2004 and 2009 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. Clin Ther 34: 124–137.
25. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD (2006) Sampling the antibiotic resistome. Science 311: 374–377.
26. Poirel L, Figueredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P (2008) *Acinetobacter radioburdenis* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 52: 1252–1256.
27. Poirel L, Berceat B, Millemann Y, Bonnin RA, Pannaux G, et al. (2012) Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. Emerg Infect Dis 18: 523–525.
28. Raoult D (2010) The post-Darwinist rhizome of life. Lancet 375: 104–105.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MK JMR GD FF DR. Performed the experiments: MK SA BS AGS SMD. Analyzed the data: MK JMR GD SA BS OM AGS SMD FF DR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MK GD SA BS OM AGS SMD. Wrote the paper: MK JMR GD SA BS OM AGS SMD FF DR.

29. Ogata H, Audie S, Barbe V, Aréguenave F, Fournier PE, et al. (2000) Selfish DNA in protein-coding genes of *Rickettsia*. *Science* 290: 317–350.
30. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, et al. (1994) The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 51: 123–137.
31. Fenollar F, Mediannikov O, Socolovschi C, Bassene H, Diatta G, et al. (2010) *Tropheryma whipplei* bacteremia during fever in rural West Africa. *Clin Infect Dis* 51: 515–521.
32. Fenollar F, Trape JF, Bassene H, Sokhna C, Raoult D (2009) *Tropheryma whipplei* in fecal samples from children, Senegal. *Emerg Infect Dis* 15: 922–924.
33. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, et al. (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49: 543–551.
34. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, et al. (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 27: 351–353.
35. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, et al. (2006) Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 44: 2974–2976.
36. Ruiz M, Martí S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J (2007) High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* 13: 1192–1198.

Non-contiguous finished genome sequence and description of *Clostridium dakareense* sp. nov.

Cheikh Ibrahima Lo¹, Ajay Kumar Mishra¹, Roshan Padhmanabhan¹, Bissoume Samb Ba², Amy Gassama Sow², Catherine Robert¹, Carine Couderc¹, Ngor Faye³, Didier Raoult¹, Pierre-Edouard Fournier¹, and Florence Fenollar^{1*}

¹Aix-Marseille Université, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), Marseille, France

²Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar 36, Dakar, Senegal

³Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Laboratoire de Parasitologie générale, Fann (Senegal)

*Correspondence: Florence Fenollar (florence.fenollar@univ-amu.fr)

Keywords: *Clostridium dakareense*, genome, culturomics, taxono-genomics

Clostridium dakareense strain FF1^T, is the type strain of *Clostridium dakareense* sp. nov., a new species within the genus *Clostridium*. This strain, whose genome is described here, was isolated from the fecal flora of a 4-month-old Senegalese child suffering from gastroenteritis. *C. dakareense* sp. nov. strain FF1^T is an obligate anaerobic Gram-positive bacillus. Here we describe the features of this organism, together with the complete genome sequence and annotation. The 3,735,762 bp long genome (1 chromosome but no plasmid) exhibits a G+C content of 27.98% and contains 3,843 protein-coding and 73 RNA genes, including 8 rRNA genes.

Introduction

Clostridium dakareense strain FF1^T (= CSUR P243 = DSM 27086), is the type strain of *Clostridium dakareense* sp. nov. This bacterium is a Gram-positive, anaerobic, spore-forming, indole negative bacillus that was isolated from the stool of a 4-month-old Senegalese child suffering from gastroenteritis as part of a “culturomics” study aiming at cultivating individually all species within human feces.

The elevated cost and lack of intra- and inter-laboratory reproducibility of the “gold standard” of taxonomic tools, i.e. DNA-DNA hybridization and G+C content determination [1], put bacterial taxonomic classification in a precarious state. In addition, the internationally-validated cutoff values of 16S rRNA sequence comparison [2] do not apply to all validly published genera and species. Recently, high throughput genome sequencing and mass spectrometric analyses of bacteria have allowed unprecedented access to a wealth of genetic and proteomic information [3]. As a consequence, we proposed to use a polyphasic approach [4] to describe new bacterial taxa, including genome

sequence, MALDI-TOF spectrum and main phenotypic characteristics [5-11].

The genus *Clostridium* (Prazmowski, 1880), classified among the *Firmicutes*, was created in 1880 [12] and consists of obligate anaerobic rod-shaped bacilli capable of producing endospores [12]. More than 180 *Clostridium* species have been described to date [13]. Members of the genus *Clostridium* are mostly environmental bacteria or associated with the commensal digestive flora of mammals, but several are major human pathogens, including *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. tetani* and *C. perfringens* [14,15]. A few species, such as *C. butyricum* and *C. pasteurianum*, fix nitrogen and have gained importance in agricultural and industrial applications [16,17].

Here we present a summary classification and a set of features for *C. dakareense* sp. nov. strain FF1^T (= CSUR P243 = DSM 27086) together with the description of the complete genomic sequencing and annotation. These characteristics support the circumscription of the species *C. dakareense* sp. nov.

Classification and features

A stool specimen was collected from a 4-month-old Senegalese child suffering from gastroenteritis. Informed consent was obtained from the child's parents and approval from the ethics committee from the Institut Federatif de Recherche 48 (Faculté de Médecine, Marseille, France). The fecal specimen was preserved at -20°C after collection and sent to Marseille. Strain FF1^T (Table 1) was isolated in July 2011 by anaerobic cultivation on 5% sheep blood-enriched Columbia agar (BioMerieux, Marcy

l'Etoile, France). This strain exhibited a 96.90% 16S rRNA nucleotide sequence similarity with *C. lituseburensis*, the phylogenetically closest validated *Clostridium* species (Figure 1). Although sequence similarity of the 16S rRNA is not uniform across taxa, this value was lower than the 98.7% threshold recommended by Stackebrandt and Ebers to delineate a new species without carrying out DNA-DNA hybridization [30]. In addition, it was consistent with 16S rRNA identity values observed among validated species within the *Clostridium* genus that range from 78.4 to 99.8%.

Table 1. Classification and general features of *Clostridium dakarensis* strain FF1^T according to the MIGS recommendations [18].

MIGS ID	Property	Term	Evidence code ^a
		Domain <i>Bacteria</i>	TAS [19]
		Phylum <i>Firmicutes</i>	TAS [20-22]
		Class <i>Clostridia</i>	TAS [23,24]
	Current classification	Order <i>Clostridiales</i>	TAS [25,26]
		Family <i>Clostridiaceae</i>	TAS [25,27]
		Genus <i>Clostridium</i>	TAS [12,25,28]
		Species <i>Clostridium dakarensis</i>	IDA
		Type strain FF1	IDA
	Gram stain	Positive	IDA
	Cell shape	Rod-shaped	IDA
	Motility	Motile	IDA
	Sporulation	Sporulating	IDA
	Temperature range	Mesophile	IDA
	Optimum temperature	37°C	IDA
MIGS-6.3	Salinity	Growth in BHI medium + 5% NaCl	IDA
MIGS-22	Oxygen requirement	Anaerobic	IDA
	Carbon source	Unknown	NAS
	Energy source	Unknown	NAS
MIGS-6	Habitat	Human gut	IDA
MIGS-15	Biotic relationship	Free living	IDA
	Pathogenicity	Unknown	
	Biosafety level	2	
MIGS-14	Isolation	Human feces	NAS
MIGS-4	Geographic location	Senegal	IDA
MIGS-5	Sample collection time	June 2011	IDA
MIGS-4.1	Latitude	13.7167	IDA
MIGS-4.1	Longitude	- 16.4167	IDA
MIGS-4.3	Depth	Surface	IDA
MIGS-4.4	Altitude	51 m above sea level	IDA

^aEvidence codes - IDA: Inferred from Direct Assay; TAS: Traceable Author Statement (i.e., a direct report exists in the literature); NAS: Non-traceable Author Statement (i.e., not directly observed for the living, isolated sample, but based on a generally accepted property for the species, or anecdotal evidence). These evidence codes are from the Gene Ontology project [29]. If the evidence is IDA, then the property was directly observed for a live isolate by one of the authors or an expert mentioned in the acknowledgements.

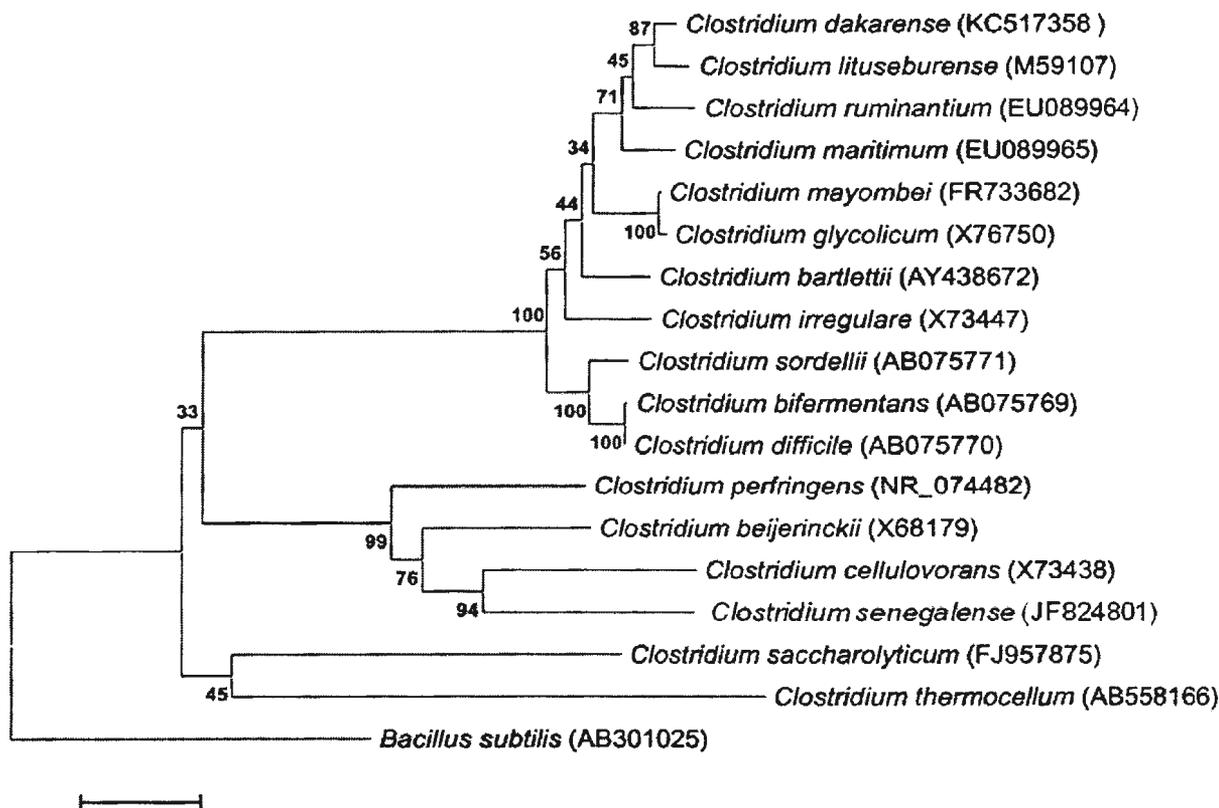


Figure 1. Phylogenetic tree highlighting the position of *C. dakareense* sp. nov. strain FF1^T relative to other type strains within the *Clostridium* genus. GenBank accession numbers are indicated in parentheses. Sequences were aligned using CLUSTALW, and phylogenetic inferences obtained using the maximum-likelihood method within the MEGA software. Numbers at the nodes are bootstrap values obtained by repeating 500 times the analysis to generate a majority consensus tree. *Bacillus subtilis* was used as an outgroup. The scale bar represents a 2% nucleotide sequence divergence.

Different growth temperatures (25, 30, 37, 45 and 56°C) were tested. Growth was observed between 25 and 37°C, with optimal growth at 37°C after 24 hours of inoculation in anaerobic conditions. Colonies were 1.5 mm in diameter and opaque and smooth appearance on blood-enriched Columbia agar. Growth of the strain was tested under anaerobic and microaerophilic conditions using GENbag anaer and GENbag microaer systems, respectively (BioMerieux), and under aerobic conditions, with or without 5% CO₂. The strain growth was obtained only in anaerobic conditions. Gram staining showed rod-shaped Gram-positive bacilli able to form spores (Figure 2). The motility test was positive. Cells grown on agar have a mean diameter of 1.2 µm (Figure 3).

Strain FF1^T exhibited neither catalase nor oxidase activities. Using API Rapid ID 32A (BioMerieux, Marcy l’Etoile), a positive reaction were observed

for arginine dihydrolase, N-acetyl-β-glucosaminidase and pyroglutamic acid arylamidase. Negative reactions were observed for urease, indole and nitrate reduction. Using API 50 CH (BioMerieux, Marcy l’Etoile), positive reactions were observed for galactose, glucose, maltose and saccharose fermentation and negative reaction were observed for ribose, lactose and fructose. *C. dakareense* is susceptible to amoxicillin, metronidazole, vancomycin, imipenem and rifampicin and resistant to trimethoprim/ sulfamethoxazole. When compared with representative species from the genus *Clostridium*, *C. dakareense* strain FF1^T exhibited the phenotypic differences detailed in Table 2.

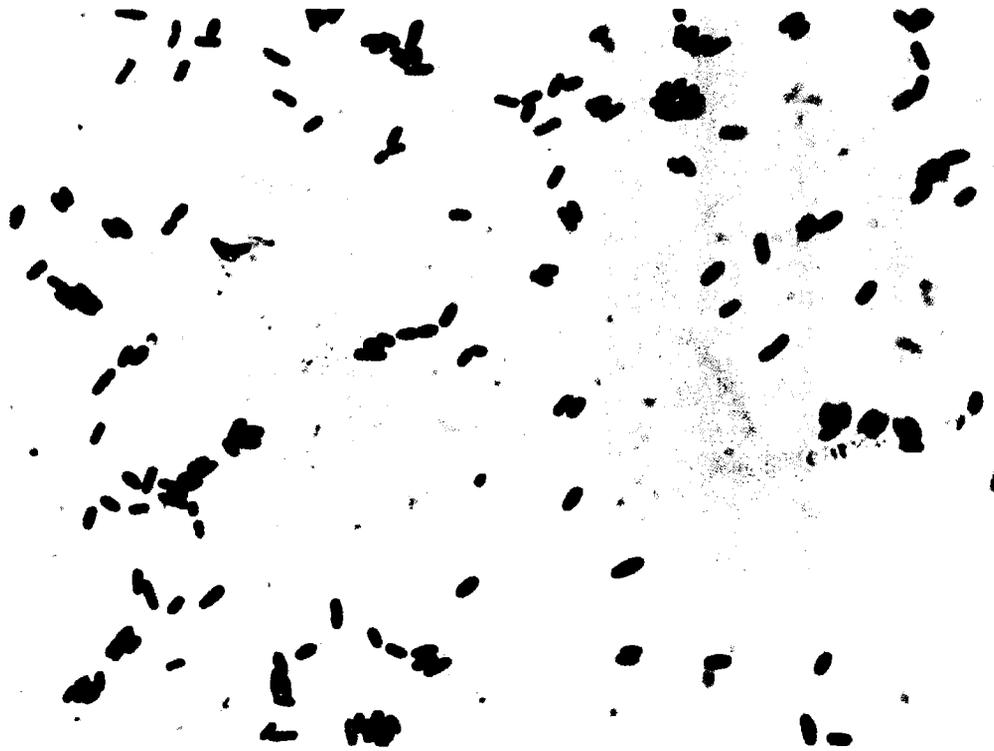


Figure 2. Gram staining of *C. dakarensis* sp. nov. strain FF1^T.

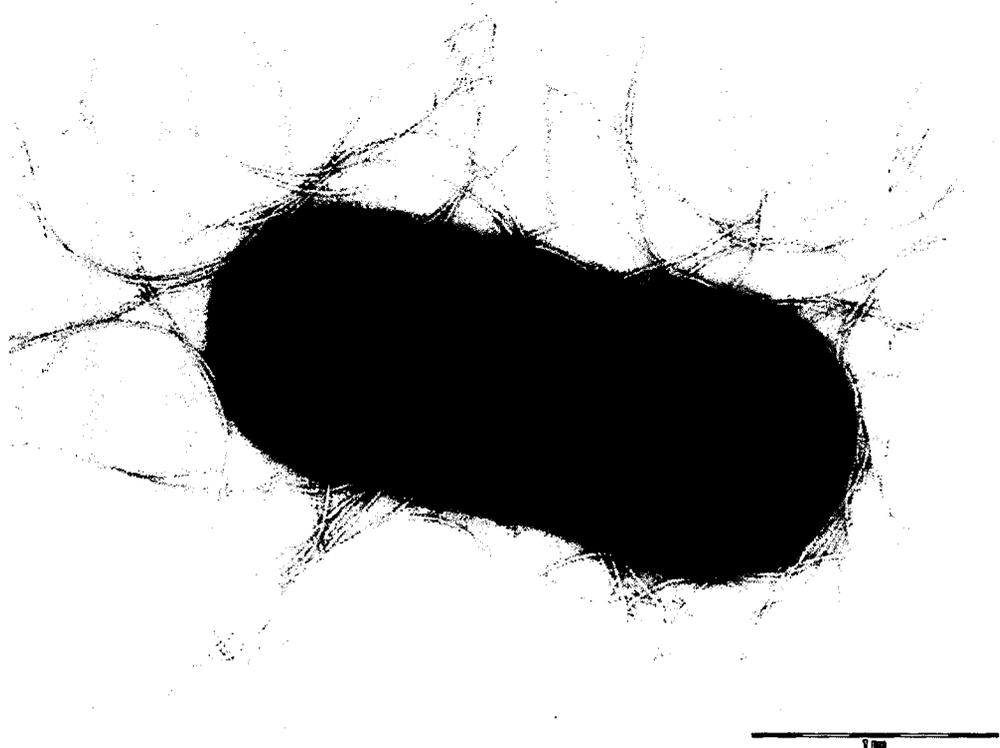


Figure 3. Transmission electron microscopy of *C. dakarensis* sp. nov. strain FF1^T, using a Morgani 268D (Philips) at an operating voltage of 60kV. The scale bar represents 1 μm.

Clostridium dakareense sp. nov.

Table 2. Differential characteristics of *C. dakareense* sp. nov. strain FF1^T (Cda)

Properties	CDa	CBa	CBe	CC	CDi	CG	CP	CSa	CSe	CT
Cell diameter (µm)	1.2	1.5	1.7	2.5	3.0	0.4-1.0	1.3	3.0	1.1	2.5
Oxygen requirement	-	-	-	-	-	-	-	-	-	na
Pigment production	-	-	-	-	+	+	+	na	-	+
Gram stain	+	+	V	-	+		+	-	+	-
Salt requirement	-	na	na	na	na	-	-	na	-	na
Motility	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
Endospore formation	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
Production of										
Acid phosphatase	+	+	na	na	na	na	+	na	na	na
Catalase	-	-	-	-	na	na	na	na	-	na
Oxidase	-	na	na	na	na	na	na	na	-	na
Nitrate reductase	-	-	-	na	-	-	+	+	-	-
Urease	-	-	-	na	na	na	na	na	-	na
β-galactosidase	-	+	na	na	na	-	+	na	-	na
Acid from										
L-Arabinose	-	na	+	-	-	-	-	+	na	na
Ribose	-	+	-		-	-	+	w	na	na
Mannose	-	-	+		+	-	+	na	na	na
Mannitol	-	+	+	+	+	-	-	w	na	na
Sucrose	-	+	+	+	+	-	+	w	na	na
D-glucose	+	+	+	+	na	+	+		na	na
D-fructose	-	+	+	+	+	+	+	+	na	na
D-maltose	+	+	+	+	-	+	+	w	na	na
D-lactose	-	na	+	+	-	-	+	w	na	na
Hydrolysis of										
Gelatin	na	-	+	-	na	-	na	na	na	+
Starch	na	na	+	-	-	-	+	-	na	
G+C content (mol%)										
	27.98	29.8	28	27	28	29	27	28	26.8	39
Habitat	Human gut	Human gut	Human gut	Poplar wood	Human gut	Mud, wastewater	Colonic flora	Sewage sludge	Human gut	Sewage sludge

C. bartlettii (CBa), *C. beijerinckii* (CBe), *C. cellulovorans* (CC), *C. difficile* (CDi), *C. glycolicum* (CG), *C. perfringens* (CP), *C. saccharolyticum* (CSa), *C. senegalense* (CSe) and *C. thermocellum* (CT).

na = data not available; w = weak, v = variable reaction

Matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS protein analysis was carried out as previously described [31]. Briefly, a pipette tip was used to pick one isolated bacterial colony from a culture agar plate, and to spread it as a thin film on a MTP 384 MALDI-TOF target plate (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany). Eighteen distinct deposits were made for strain FF1^T from eighteen isolated colonies. Each smear was overlaid with 2 μ L of matrix solution (saturated solution of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) in 50% acetonitrile, 2.5% tri-fluoroacetic-acid, and allowed to dry for five minutes. Measurements were performed with a Microflex spectrometer (Bruker). Spectra were recorded in the positive linear mode for the mass range of 2,000 to 20,000 Da (parameter settings: ion source 1 (IS1), 20 kV; IS2, 18.5 kV; lens, 7 kV). A spectrum was obtained after 675 shots at a variable laser power. The time of acquisition was between 30 seconds and 1 minute per spot. The eighteen spectra were imported into the MALDI BioTyper software (version 2.0,

Bruker) and analyzed by standard pattern matching (with default parameter settings) against the main spectra of 4,706 bacteria including 216 spectra from validly published species of *Clostridium*, that are part of the reference data contained in the BioTyper database. The method of identification included the m/z from 2,000 to 20,000 Da. For every spectrum, 100 peaks at most were taken into account and compared with spectra in the database. A score enabled the identification, or not, from the tested species: a score > 2 with a validly published species enabled the identification at the species level, and a score < 1.7 did not enable any identification at the genus level. For strain FF1^T, the maximal obtained score was lower than 1.9, thus suggesting that our isolate was not a member of a known species. We added the spectrum from strain FF1^T to our database for future reference (Figure 4). Finally, the gel view allows us to highlight the spectrum differences with other members of the genus *Clostridium* (Figure 5).

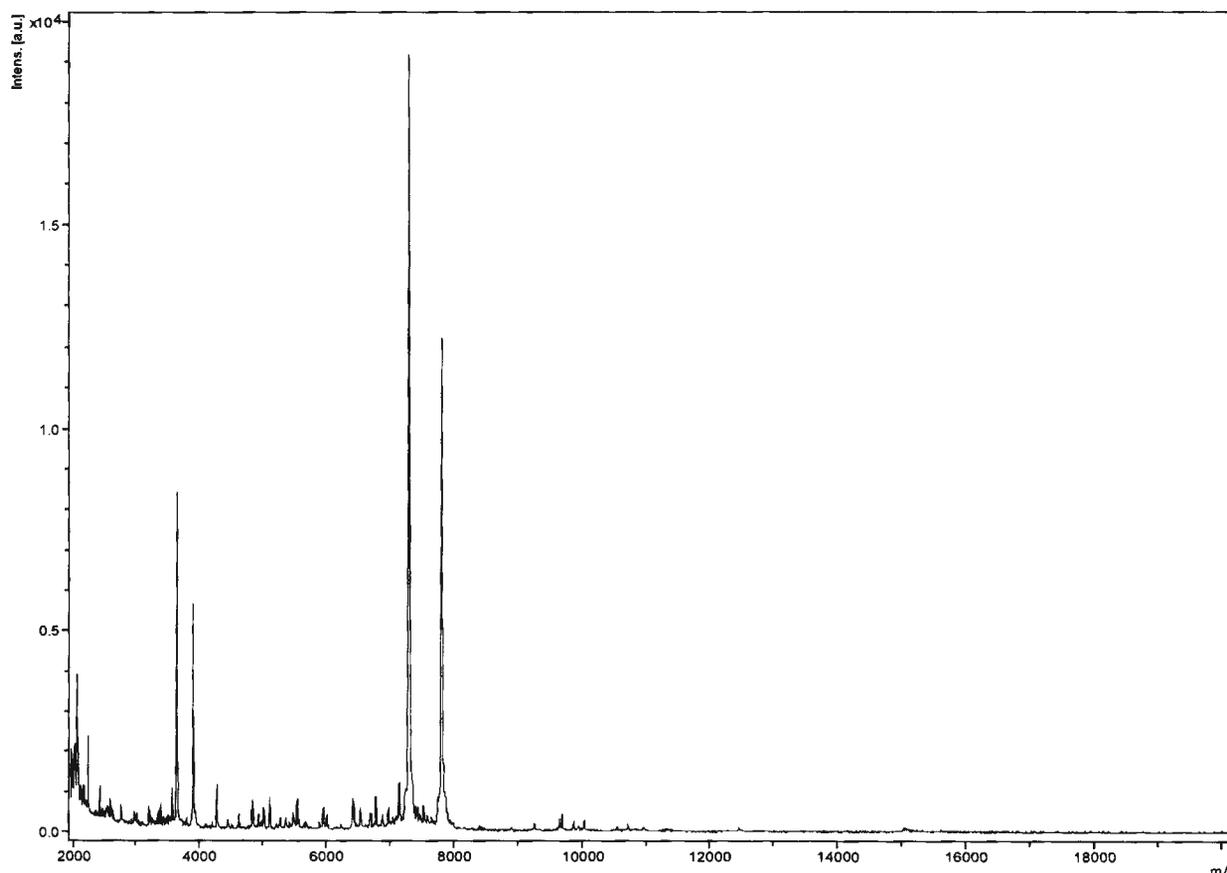


Figure 4. Reference mass spectrum from *C. dakarensis* strain FF1^T. Spectra from 18 individual colonies were compared and a reference spectrum was generated.

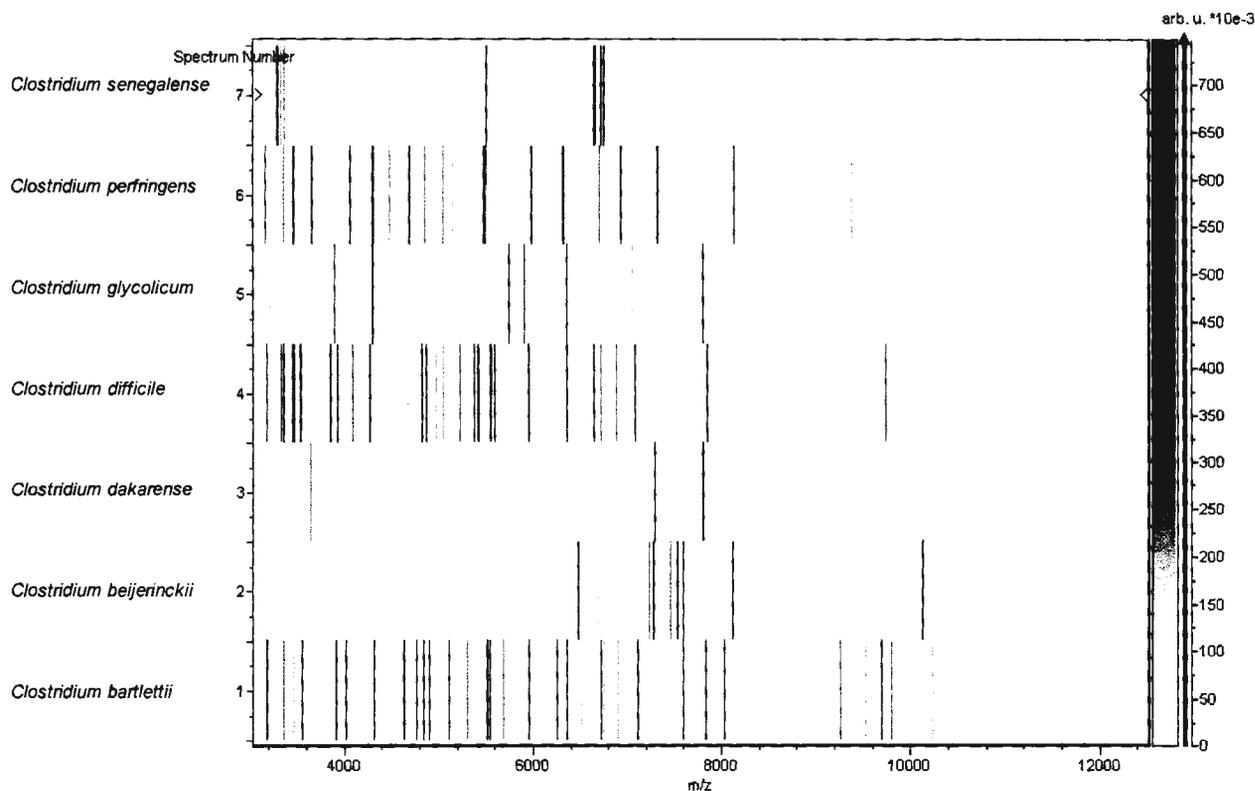


Figure 5. Gel view comparing *C. dakarensis* sp. nov. strain FF1^T spectra with other members of the *Clostridium* genus (*C. bartlettii*, *C. beijerinckii*, *C. difficile*, *C. glycolicum*, *C. perfringens*, *C. senegalense*). The Gel View displays the raw spectra of all loaded spectrum files arranged in a pseudo-gel like look. The x-axis records the m/z value. The left y-axis displays the running spectrum number originating from subsequent spectra loading. The peak intensity is expressed by a Gray scale scheme code. The color bar and the right y-axis indicate the relation between the color a peak is displayed with and the peak intensity in arbitrary units.

Genome sequencing information

Genome project history

The organism was selected for sequencing on the basis of its phylogenetic position and 16S rRNA similarity to other members of the genus *Clostridium*, and is part of a “culturomics” study of the human digestive flora aiming at isolating all bacterial species within human feces. It was the 94th genome of a *Clostridium* species and the first genome of *Clostridium dakarensis* sp. nov. The Genbank accession number is CBTZ00000000 and consists of 257 contigs. Table 3 shows the project information and its association with MIGS version 2.0 compliance [32].

Growth conditions and DNA isolation

C. dakarensis sp. nov. strain FF1^T (= CSUR P243 = DSM 27086), was grown anaerobically on sheep blood-enriched Columbia agar medium at 37°C. Eight petri dishes were spread and resuspended in 4x100µl of G2 buffer (EZ1 DNA Tissue kit, Qiagen). A first mechanical lysis was performed by glass powder on the Fastprep-24 device (Sample Preparation system) from MP Biomedicals, USA) using 2x20 seconds cycles. DNA was then treated with 2.5 µg/µL lysozyme (30 minutes at 37°C) and extracted through the BioRobot EZ 1 Advanced XL (Qiagen). The DNA was then concentrated and purified on a Qiaamp kit (Qiagen). DNA concentration was 70.7ng/µl as determined by the Genios Tecan fluorometer, using the Quant-it Picogreen kit (Invitrogen).

Table 3. Project information

MIGS ID	Property	Term
MIGS-31	Finishing quality	High-quality draft
MIGS-28	Libraries used	One 454 paired end 3-kb library
MIGS-29	Sequencing platforms	454 GS FLX Titanium
MIGS-31.2	Fold coverage	35
MIGS-30	Assemblers	Newbler version 2.5.3
MIGS-32	Gene calling method	Prodigal
	Genbank ID	CBTZ00000000
	Genbank Date of Release	
MIGS-13	Project relevance	Study of the human gut microbiome

Genome sequencing and assembly

This project was loaded twice on a 1/4 region for the paired-end application and once on a 1/8 region for the shotgun on PTP Picotiterplates. The shotgun library was constructed with 500 ng of DNA as described by the manufacturer (Roche) with the GS Rapid library Prep kit. For the paired-end sequencing, 5 µg of DNA was mechanically fragmented on the Hydroshear device (Digilab, Holliston, MA, USA) with an enrichment size of 3-4kb. The DNA fragmentation was visualized using an Agilent 2100 BioAnalyzer on a DNA labchip 7500, which yield an optimal size of 3.6 kb. The library was constructed according to the 454_Titanium paired-end protocol and manufacturer. Circularization and nebulization were performed and generated a pattern with an optimum at 561 bp. After PCR amplification through 15 cycles followed by double size selection, the single stranded paired end library was then quantified with Quant-it Ribogreen kit (Invitrogen) on the Genios_Tecan fluorometer at 52 pg/µL. The library concentration equivalence was calculated as 1.7E+08 molecules/µL. The library was stored at -20°C until use.

The shotgun library was clonally amplified with 3cpb in 3 emPCR reactions and the paired end library was amplified with lower cpb (1cpb) in 4 emPCR reactions with the GS Titanium SV emPCR Kit (Lib-L) v2. The yield of the emPCR was 5.37% for the shotgun reads and 19.27% for the paired-end reads, according to the quality expected by the range of 5 to 20% from the Roche procedure. A total of 340,000 beads from the 1/8 region of

the shotgun reads and 790,000 beads from the 1/4 region of the paired-end reads were loaded on the GS Titanium PicoTiterPlates (PTP Kit 70×75) and sequenced with the GS Titanium Sequencing Kit XLR70.

The runs were performed overnight and then analyzed on the cluster through the gsRunBrowser and gsAssembler_Roche. The global 383,079 passed filter sequences generated 96.50 Mb with a length average of 277 bp. These sequences were assembled using the Newbler software from Roche with 90% identity and 40 bp as overlap. Fourteen scaffolds and 257 large contigs (>1500bp) were obtained, for a genome size of 3,735,762 bp.

Genome annotation

Open Reading Frames (ORFs) were predicted using Prodigal [33] with default parameters but the predicted ORFs were excluded if they spanned a sequencing gap region. The predicted bacterial protein sequences were searched against the GenBank database [34] and the Clusters of Orthologous Groups (COG) databases using BLASTP. The tRNAScanSE tool [35] was used to find tRNA genes, whereas ribosomal RNAs were found by using RNAmmer [36] and BLASTn against the GenBank database. Lipoprotein signal peptides and numbers of transmembrane helices were predicted using SignalP [37] and TMHMM [38] respectively. ORFans were identified if their BLASTP *E*-value was lower than 1e⁻⁰³ for alignment length greater than 80 amino acids. If alignment lengths

were smaller than 80 amino acids, we used an *E*-value of 1e-05. Such parameter thresholds have already been used in previous works to define ORFans. Artemis [39] was used for data management and DNA Plotter [40] was used for visualization of genomic features. Mauve alignment tool was used for multiple genomic sequence alignment and visualization [41].

To estimate the mean level of nucleotide sequence similarity at the genome level between *C. dakareense* and nine other members of the genus *Clostridium* (Table 6), we use the Average Genomic Identity of gene Sequences (AGIOS) home-made software. Briefly, this software combines the Proteinortho software [42] for detecting orthologous proteins between genomes compared two by two, then retrieves the corresponding genes and determines the mean percentage of nucleotide sequence identity among orthologous ORFs using the Needleman-Wunsch global alignment algorithm. *Clostridium dakareense* strain FF1^T, was compared to *C. bartlettii* strain DSM 16795 (GenBank accession number NZ_DS499569), *C. beijerinckii* strain NCIMB 8052 (NC_009617), *C. cellulovorans* strain 743B (NC_014393), *C. difficile*

strain 630 (NC8009089), *C. glycolicum* strain ATCC 14880 (ARES01000000), *C. perfringens* strain ATCC 13124 (BA000016), *C. saccharolyticum* strain WM1 (NC_014376), *C. senegalense* strain JC122^T (CAEV00000000), and *C. thermocellum* strain ATCC 27405 (CP000568).

Genome properties

The genome of *C. dakareense* sp. nov. strain FF1^T is 3,735,762 bp long (1 chromosome, but no plasmid) with a 27.98% G + C content of (Figure 6 and Table 4). Of the 3,916 predicted genes, 3,843 protein-coding genes, and 73 were RNAs. Eight rRNA genes (one 16S rRNA, one 23S rRNA and six 5S rRNA) and 65 predicted tRNA genes were identified in the genome. A total of 2,769 genes (72.05%) were assigned a putative function (by COG or NR blast). Two hundred ninety-eight genes were identified as ORFans (7.75%). The remaining 515 genes were annotated as hypothetical proteins (13, 40%). The distribution of genes into COGs functional categories is presented in Table 4. The properties and the statistics of the genome are summarized in Tables 4 and 5.

Table 4. Nucleotide content and gene count levels of the genome.

Attribute	Value	% of total ^a
Genome size (bp)	3,735,762	100
DNA coding region (bp)	3,239,020	86.70
DNA G+C content (bp)	1,045,424	27.98
Total genes	3,916	100
RNA genes	73	1.86
Protein-coding genes	3,843	98.14
Genes with function prediction	2,769	72.05
Genes assigned to COGs	2,849	74.13
Genes with peptide signals	410	10.67
Genes with transmembrane helices	1,016	26.44

^aThe total is based on either the size of the genome in base pairs or the total number of protein coding genes in the annotated genome

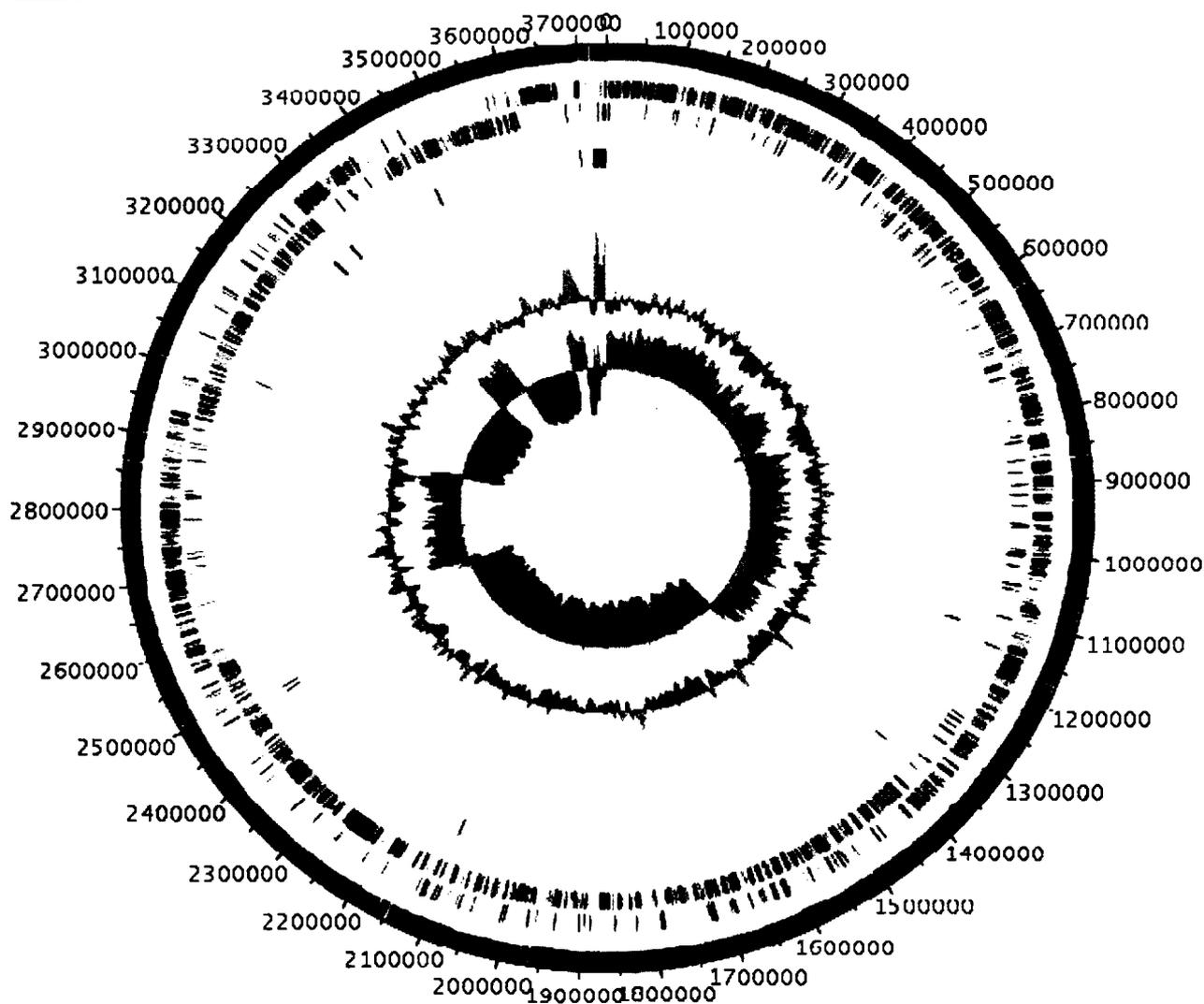


Figure 6. Graphical circular map of the chromosome. From the outside in, the outer two circles show open reading frames oriented in the forward and reverse directions (colored by COG categories), respectively. The third circle marks the rRNA gene operon (red) and tRNA genes (green). The fourth circle shows the G+C% content plot. The inner-most circle shows the GC skew, purple and olive indicating negative and positive values, respectively.

Comparison with the genomes from other *Clostridium* species

The genome sequence of *Clostridium* sp. is currently available for more than seventy-five *Clostridium* species. Here we compared the genome sequence of *C. dakarensis* strain FF1^T with those of *C. bartlettii*, *C. beijerinckii*, *C. cellulovorans*, *C. difficile*, *C. glycolicum*, *C. perfringens*, *C. saccharolyticum*, *C. senegalense*, and *C. thermocellum*.

The draft genome sequence of *C. dakarensis* strain FF1^T is smaller than those of *C. cellulovorans*, *C. beijerinckii*, *C. senegalense*, *C. saccharolyticum*, *C. thermocellum*, *C. difficile*, *C. glycolicum* (3.73, 5.26,

6.0, 3.89, 4.66, 3.84, 4.3 and 3.99 Mb, respectively) but larger than those of *C. perfringens* and *C. bartlettii* (3.26 and 2.97 Mb, respectively). The G+C content of *C. dakarensis* is lower than those of *C. cellulovorans*, *C. beijerinckii*, *C. perfringens*, *C. saccharolyticum*, *C. thermocellum*, *C. difficile* (31.2, 29.9, 28.4, 45, 39 and 29.1%, respectively) but higher than those of *C. bartlettii*, *C. glycolicum* and *C. senegalense* (28.8, 28 and 26.8%, respectively). The gene content of *C. dakarensis* is larger than those of *C. thermocellum*, *C. senegalense*, *C.*

perfringens, *C. glycolicum*, *C. bartlettii* (3,916, 3,173, 3,761, 2,876, 3,840 and 2,787, respectively) and smaller than those of *C. cellulovorans*, *C. beijerinckii*, *C. saccharolyticum* and *C. difficile*, (4,501, 5,243, 4,154 and 4,019, respectively). The ratio of genes per Mb of *C. dakarensis* is larger to those of *C. cellulovorans*, *C. beijerinckii*, *C. senegalense*, *C. saccharolyticum*, *C. thermocellum*, *C. difficile*, *C. bartlettii*, *C. glycolicum* and *C.*

perfringens (1,049, 856, 874, 966, 891, 826, 934, 938, 962 and 882, respectively).

The number of orthologous genes shared between *C. dakarensis* and other compared *Clostridium* species has been summarized in Table 6. The average percentage of nucleotide sequence identity ranged from 62.05 to 74.5% among previously published *Clostridium* species, and from 61.94 to 75.7% between *C. dakarensis* and other studied *Clostridium* species, thus confirming its new species status.

Table 5. Number of genes associated with the 25 general COG functional categories.

Code	Value	%age ^a	Description
J	171	4.45	Translation
A	0	0	RNA processing and modification
K	325	8.46	Transcription
L	158	4.11	Replication, recombination and repair
B	1	0.03	Chromatin structure and dynamics
D	34	0.88	Cell cycle control, mitosis and meiosis
Y	0	0	Nuclear structure
V	111	2.89	Defense mechanisms
T	225	5.85	Signal transduction mechanisms
M	165	4.29	Cell wall/membrane biogenesis
N	58	1.51	Cell motility
Z	0	0	Cytoskeleton
W	0	0	Extracellular structures
U	45	1.17	Intracellular trafficking and secretion
O	95	2.47	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
C	194	5.04	Energy production and conversion
G	248	6.45	Carbohydrate transport and metabolism
E	248	6.45	Amino acid transport and metabolism
F	88	2.29	Nucleotide transport and metabolism
H	117	3.04	Coenzyme transport and metabolism
I	72	1.87	Lipid transport and metabolism
P	181	4.71	Inorganic ion transport and metabolism
Q	52	1.35	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	386	10.04	General function prediction only
S	261	6.79	Function unknown
-	994	25.87	Not in COGs

^aThe total is based on the total number of protein coding genes in the annotated genome.

Table 6. Numbers of orthologous proteins shared between genomes (upper right)

	CDa	CC	CBe	CP	CSe	CSa	CT	CBa	CG	CDi
CDa	3,808	1,045	1,230	1,089	1,131	1,013	806	1,324	1,690	1,203
CC	68.22	4,254	1,490	1,163	1,181	1,057	967	871	1,038	1,021
CBe	68.84	70.36	5,020	1,300	1,289	1,207	968	989	1,204	1,129
CP	70.02	70.43	72.15	2,660	1,168	920	777	845	1,005	1,147
CSe	69.91	70.37	70.82	70.13	3,704	930	821	856	1,134	1,008
CSa	61.94	62.50	62.44	62.22	62.05	4,154	854	833	1,004	998
CT	64.49	64.84	64.56	64.78	64.53	63.83	3,173	713	840	952
CBa	74.98	68.22	68.84	69.46	69.52	62.15	64.73	2,787	1,517	1,303
CG	75.70	68.28	68.83	69.49	69.57	62.26	64.59	76.04	3,840	1,568
CDi	71.34	69.57	68.52	71.52	65.49	66.37	64.32	74.45	74.50	3,798

average percentage similarity of nucleotides corresponding to orthologous protein shared between genomes (lower left) and numbers of proteins per genome (bold). CDa: *C. dakarensis*; CC: *C. cellulovorans*; CBe: *C. beijerinckii*; CP: *C. perfringens*; CSe: *C. senegalensis*; CSa: *C. saccharolyticum*; CT: *C. thermocellum*; CBa: *C. bartlettii*; CG: *C. glycolicum*; CDi: *C. difficile*.

Conclusion

On the basis of phenotypic, phylogenetic and genomic analyses, we formally propose the creation of *Clostridium dakarensis* sp. nov. which contains strain FF1^T. This bacterium strain has been isolated from the fecal flora of a 4-months-old Senegalese child suffering from gastroenteritis.

Description of *Clostridium senegalense* sp. nov.

Clostridium dakarensis (da.kar.e'n.se. L. gen. neutr. n. *dakarensis*, pertaining to, or originating from Dakar, the capital of Senegal, where the type strain was isolated).

Colonies were 1.5 mm in diameter on blood-enriched Columbia agar and Chocolate agar + PolyViteX. Cells are rod-shaped with a mean diameter of 1.2 µm. Optimal growth is achieved anaerobically. No growth is observed in aerobic conditions. Growth occurs between 25-37°C, with

optimal growth observed at 37°C, in medium 5% sheep blood-enriched Columbia agar. Cells stain Gram-positive, are endospore-forming, and motile. Catalase, oxidase, urease, indole and nitrate reduction activity are absent. Arginine dihydrolase, N-acetyl-β-glucosanimidase and pyroglutamic acid arylamidase activity are present. Cells are susceptible to amoxicillin, metronidazole, vancomycin, imipenem and rifampicin but resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole.

The G+C content of the genome is 27.98%. The 16S rRNA gene sequence and whole-genome shotgun sequence of *C. dakarensis* strain FF1^T (= CSUR P243 = DSM 27086) are deposited in GenBank under accession numbers KC517358 and CBTZ00000000, respectively. The type strain FF1^T (= CSUR P243 = DSM 27086) was isolated from the fecal flora of a 4-months-old child in Dakar, Senegal.

Acknowledgements

The authors thank the Xegen Company (www.xegen.fr) for automating the genomic annotation process. This

study was funded by the Mediterranean-Infection Foundation.

References

1. Rossello-Mora R. DNA-DNA Reassociation Methods Applied to Microbial Taxonomy and Their Critical Evaluation. In: Stackebrandt E (ed), Molecular Identification, Systematics, and population Structure of Prokaryotes. Springer, Berlin, 2006, p. 23-50.
2. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 2006; **33**:152-155.
3. Welker M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 2011; **34**:2-11. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.013) <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.013>
4. Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; **60**:249-266. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0) <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
5. Kokcha S, Mishra AK, Lagier JC, Million M, Leroy Q, Raoult D, Fournier PE. Non contiguous-finished genome sequence and description of *Bacillus timonensis* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 2012; **6**:346-355. [PubMed](http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2776064) <http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2776064>
6. Lagier JC, El Karkouri K, Nguyen TT, Armougom F, Raoult D, Fournier PE. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Anaerococcus senegalensis* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 2012; **6**:116-125. [PubMed](http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2415480) <http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2415480>
7. Mishra AK, Gimenez G, Lagier JC, Robert C, Raoult D, Fournier PE. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Alistipes senegalensis* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 2012; **6**:304-314. <http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2625821>
8. Lagier JC, Armougom F, Mishra AK, Ngyuen TT, Raoult D, Fournier PE. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Alistipes timonensis* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 2012; **6**:315-324. [PubMed](http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2625821)
9. Mishra AK, Lagier JC, Robert C, Raoult D, Fournier PE. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Clostridium senegalense* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 2012; **6**:386-395. [PubMed](http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2625821)
10. Mishra AK, Lagier JC, Robert C, Raoult D, Fournier PE. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Peptoniphilus timonensis* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 2012; **7**:1-11. [PubMed](http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2956294) <http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2956294>
11. Mishra AK, Lagier JC, Rivet R, Raoult D, Fournier PE. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Paenibacillus senegalensis* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 2012; **7**:70-81. [PubMed](http://dx.doi.org/10.4056/sigs.2956294)
12. Prazmowski A. "Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Arten." Ph.D. Dissertation, University of Leipzig, Germany, 1880, p. 366-371.
13. List of prokaryotic names with standing with nomenclature. <http://www.bacterio.net>
14. Evaluations and Standards Laboratory. "Identification of *Clostridium* species", 2008 pp. 14.
15. Wells CL, Wilkins TD. (1996). *Clostridia*: Spore forming Anaerobic Bacilli In: *Baron's Medical Microbiology* (Baron S et al., eds.) (4th ed.). University of Texas Medical Branch.
16. Keis S, Shaheen R, David T. Jones Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; **51**:2095-2103. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-6-2095) <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-6-2095>
17. Carnahan JE, Castle JE. Nitrogen Fixation. *Annu Rev Plant Physiol* 1963; **14**:125-136. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.14.060163.001013>
18. Field D, Garrity G, Gray T, Morrison N, Selengut J, Sterk P, Tatusova T, Thomson N, Allen MJ, Angiuoli SV, et al. The minimum information about a genome sequence(MIGS) specification. *Nat Biotechnol* 2008; **26**:541-547. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1038/nbt1360) <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1360>
19. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eukarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**:4576-4579. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576) <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
20. Gibbons NE, Murray RGE. Proposals Concerning the Higher Taxa of Bacteria. *Int J Syst Bacteriol*

- 1978; **28**:1-6. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-28-1-1>
21. Garrity GM, Holt JG. The Road Map to the Manual. In: Garrity GM, Boone DR, Castenholz RW (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume 1, Springer, New York, 2001, p. 119-169.
 22. Murray RGE. The Higher Taxa, or, a Place for Everything...? In: Holt JG (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, First Edition, Volume 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984, p. 31-34.
 23. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. List no. 132. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; **60**:469-472. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.022855-0>
 24. Rainey FA. Class II. *Clostridia* class nov. In: De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume 3, Springer-Verlag, New York, 2009, p. 736.
 25. Skerman VBD, Sneath PHA. Approved list of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 1980; **30**:225-420. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
 26. Prévot AR. In: Hauderoy P, Ehringer G, Guillot G, Magrou J., Prévot AR, Rosset D, Urbain A (eds), *Dictionnaire des Bactéries Pathogènes*, Second Edition, Masson et Cie, Paris, 1953, p. 1-692.
 27. Pribram E. Klassifikation der Schizomyceten. Klassifikation der Schizomyceten (Bakterien), Franz Deuticke, Leipzig, 1933, p. 1-143.
 28. Smith LDS, Hobbs G. Genus III. *Clostridium* Prazmowski 1880, 23. In: Buchanan RE, Gibbons NE (eds), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eighth Edition, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, p. 551-572.
 29. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; **25**:25-29. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1038/75556) <http://dx.doi.org/10.1038/75556>
 30. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 2006; **33**:152-155.
 31. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; **49**:543-551. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1086/600885) <http://dx.doi.org/10.1086/600885>
 32. Field D, Garrity G, Gray T, Morrison N, Selengut J, Sterk P, Tatusova T, Thomson N, Allen MJ, Angiuoli SV, et al. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nat Biotechnol* 2008; **26**:541-547. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1038/nbt1360) <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1360>
 33. Prodigal. <http://prodigal.ornl.gov>
 34. GenBank database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
 35. Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**:955-964. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm160)
 36. Lagesen K, Hallin P, Rodland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**:3100-3108. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm160) <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm160>
 37. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; **340**:783-795. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028>
 38. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001; **305**:567-580. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315) <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
 39. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 2000; **16**:944-945. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/16.10.944) <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/16.10.944>
 40. Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* 2009; **25**:119-120. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn578) <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn578>
 41. Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 2004; **14**:1394-1403. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1101/gr.2289704) <http://dx.doi.org/10.1101/gr.2289704>
 42. Lechner M, Findeib S, Steiner L, Marz M, Stadler PF, Prohaska SJ. Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics* 2011; **12**:124. [PubMed](http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-12-124) <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-12-124>

Etiologies des diarrhées

Les étiologies de diarrhée sont soit parasitaires, virales ou bactériennes. La population d'étude était très jeune car 49% des enfants étaient âgés de moins de 5 ans. Les selles les plus fréquemment rencontrées étaient liquides et glaireuses (76%). Les selles sanglantes étaient toujours liquides et accompagnées de glaires et elles ne représentaient que 10% de notre échantillon d'étude. Il existe un lien statistiquement significatif ($p=0,003$) entre shigellose et selles sanglantes, ce qui est une donnée retrouvée habituellement dans d'autres études. Toutefois, il est possible d'isoler des germes de *Shigella* dans des selles non sanglantes. Dans cette étude, le taux d'infection à *Shigella* était de 10%. Les taux d'infection rapportés dans d'autres études faites dans des pays en voie de développement tel que l'Inde, étaient de 62,5% en 2004, 63,1% en 2005 et 45,9% en 2006 (Samal 2008). Les résultats ont montré, qu'au moins un agent pathogène entérique a été isolé chez plus de 60% des patients souffrant de diarrhée. Les agents pathogènes entériques les plus couramment isolés au cours de cette étude ont été les bactéries 50,5% (152/301) suivis des parasites 45,5% (137/301) et des virus 25,5% (77/301). La répartition des agents pathogènes varie selon le climat et le niveau d'hygiène avec le plus souvent une prédominance des étiologies parasitaires dans les pays en voie de développement (Imbert 2001). Les causes de la diarrhée aiguë comprennent un large éventail de virus, bactéries et parasites (Guerrant 1990). Les caractéristiques et les motifs de l'isolement des agents étiologiques également peuvent varier d'un endroit à l'autre en fonction du climat, de la nourriture et de l'eau, de l'hygiène, de l'assainissement, la géographie et les éléments socio-économiques (Thapar 2004). Les principaux agents responsables de maladies diarrhéiques varie selon l'âge. Ainsi, dans notre étude, les enfants de moins de 5 ans ont été les plus affectés par les diarrhées virales (55,8%), suivies de celles bactériennes (28%) et parasitaires (16%). Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans d'autres études menées dans des zones rurales d'Afrique, chez l'adulte (Okeke 2003; Brooks 2006) et chez l'enfant (Mandomando 2008; Nietieman 2011). Il peut arriver que des bactéries commensales du tube digestif soient responsables de cas de diarrhée. Dans une étude réalisée au Sénégal, des souches de *Klebsiella pneumoniae* sub-espèce *ozonae* étaient responsables de diarrhée (Gassama-Sow 2010).

La prééminence des étiologies virales chez les enfants de moins de 5 ans dans notre étude, notamment les Rotavirus 14% (43/301) concorde avec les travaux de Carraturo, qui rapportent qu'ils occupent la première place dans les diarrhées aiguës infantiles dans le monde (Carraturo 2008). Des résultats similaires ont été rapportés au Nigéria (18%) (Aminu 2008), et en Italie (27,6%) (Carraturo 2008). Ces infections surviennent sur un mode épidémique et

Discussion

saisonnier, notamment dans les collectivités, et en général pendant la saison fraîche ou sèche des pays chauds et pendant l'hiver dans l'hémisphère nord. Aux Etats-Unis deux vaccins ont été mis sur le marché, en février 2006 et avril 2008, l'un est connu sous le nom de Rota Teq®, l'autre est le Rotarix®. Ces vaccins devraient être inclus dans le Programme élargi de vaccination (PEV), vu le fort taux de prévalence des Rotavirus chez les enfants de moins de 5 ans au Sénégal. Au cours de cette étude, les agents étiologiques bactériens les plus fréquemment retrouvés étaient: *Escherichia coli* enteropathogène (EPEC) et *Shigella* spp. Ces résultats sont cohérents avec ceux des études antérieures (Vargas 2004 ; Brooks 2006). Contrairement aux études précédentes (Vargas 2004 ; Nietieman 2011), le pic des infections bactériennes a été observé au cours de la saison des pluies. A Dakar et sa banlieue, la saison des pluies correspond aux mois les plus chauds et à la période d'inondations, responsables de mauvaises conditions d'hygiène et multiplient les contacts avec les eaux usées. Ainsi, le grand nombre d'épisodes diarrhéiques peut résulter d'une exposition accrue aux agents pathogènes environnementaux et des aliments contaminés. Deux souches d'EHEC (*Escherichia coli* entérohémorragiques) ont été isolées chez un enfant et chez un adulte. Seule une souche de *Campylobacter* spp (0,6%) a été isolée au cours de l'étude. Ce qui est relativement très faible et est similaire à la situation qui prévaut dans la plupart des autres pays africains. La prévalence des VTEC et des infections à *Campylobacter* au Sénégal est similaire à celle décrite au Ghana et en Tanzanie (Vargas 2004 ; Reither 2007), mais inférieure à celle des autres pays africains (Kenya, Nigéria, Mozambique) (Coker 2002; Okeke 2003; Brooks 2006; Mandomando 2008). Les souches de *Escherichia coli* peuvent être responsables de cas de diarrhée surtout chez les enfants de moins de 5 ans, chez lesquels on peut isoler des EPEC (*Escherichia coli* entéropathogènes, et EHEC (*Escherichia coli* entérohémorragiques) (Gassama-Sow 2004).

La présente étude a également confirmé que le Rotavirus et autres virus sont des agents pathogènes importants chez les enfants de moins de 2 ans, ce qui confirme leur rôle dans la survenue de la diarrhée pédiatrique (Nietieman 2011). En outre, une fréquence plus élevée de l'infection virale a été observée pendant la période sèche et froide, ce qui démontre ce qui a déjà été observé dans d'autres pays d'Afrique subsaharienne comme au Burkina Faso (Nietieman 2011), au Ghana (Reither 2007), et en Tanzanie (Vargas 2004).

Les parasites ont été retrouvés chez environ un quart des patients. Les infections parasitaires survenaient plus fréquemment chez les patients de plus de 5 ans. Cependant, la prévalence observée chez les enfants de moins de 5 ans était similaire à celle déjà publiée en Tanzanie

Discussion

(Vargas 2004) et au Burkina (Nieteman 2011).

Dans les pays en développement, il n'est pas rare d'isoler plus d'un pathogène entérique chez le même patient (Okeke 2003). Dans cette étude, la co-infection avec des entéropathogènes potentiels s'est produite dans un cinquième des patients inclus. Cela concorde avec les conclusions d'une étude réalisée au Ghana (Reither 2007), mais légèrement inférieures à celles décrites au Kenya (Shapiro 2001). Malheureusement, dans chaque association, le rôle relatif d'un entéropathogène unique pour les symptômes cliniques ne peut être déterminé. Néanmoins, l'interprétation des données sur les infections mixtes virales et bactériennes est compliquée par le fait que dans de nombreux cas d'infections mixtes un des entéropathogènes potentiels ne peut pas contribuer à l'étiologie des maladies diarrhéiques. En raison de la taille limitée de l'échantillon, nous n'avons pas été en mesure de rechercher d'autres indicateurs de diarrhée sévère chez les patients présentant des infections mixtes (par exemple, l'admission à une unité de soins intensifs ou de décès) qui méritent un examen plus approfondi.

Bien que cette étude prospective constitue l'une des analyses les plus approfondies de la diarrhée chez les enfants et les adultes surtout en milieu urbain à ce jour, elle a ses limites. Tout d'abord, la taille limitée de l'échantillon est l'une des raisons du fait qu'aucune association entre la diarrhée et les facteurs de risque connus ou de l'exposition n'a été identifiée. La taille limitée de l'échantillon était due aux difficultés à recruter des patients qui répondaient aux critères d'inclusion; ainsi 19% des patients ont été exclus parce qu'ils avaient rapporté une prise préalable d'antibiotiques ou antiparasitaires. Deuxièmement, la présente étude reflète la prévalence des maladies diarrhéiques chez les personnes en quête de soins, ce qui peut ne pas représenter le fardeau de la maladie dans la communauté urbaine dans son ensemble. En outre, la population incluse était plus de trois fois composée d'enfants de moins de 5 ans que d'adultes dans la population en général dans les zones étudiées, ce qui reflète probablement le fait que pour les jeunes enfants atteints de diarrhée le seuil de recours aux soins est probablement plus faible. Enfin, le dépistage d'échantillons de selles provenant d'une population contrôle a été réalisé afin d'évaluer l'ampleur du portage asymptomatique des entéropathogènes. Cependant au niveau de cette population contrôle, l'absence d'informations cliniques adéquates aurait conduit à une interprétation différente des résultats de patients étudiés. Toutefois, indépendamment de ces limites, cette étude a démontré d'une part, que dans un milieu urbain au Sénégal, les maladies diarrhéiques sont principalement associées à des bactéries entériques avec une saisonnalité marquée pendant la saison des pluies. D'autre

Discussion

part, chez les enfants de moins de 5 ans, les infections virales, en particulier les Rotavirus, étaient prédominants, avec un pic marqué pendant la saison sèche. Le contexte urbain avec ses conditions de vie spécifiques (expansion incontrôlée des bidonvilles et des quartiers informels, les logements surpeuplés, dégradation de l'environnement ...) peuvent expliquer ces schémas.

En complément, d'autres recherches, avec une taille d'échantillon plus grande ou d'un groupe de contrôle, sont nécessaires pour déterminer le fardeau des maladies diarrhéiques au Sénégal dans les communautés urbaines et d'identifier les facteurs spécifiques liés aux phénomènes d'urbanisation.

Résistance aux antibiotiques

Les entérobactéries représentent la majorité des infections à bacille à Gram négatif (BGN). Elles peuvent tout aussi bien être responsables d'infections communautaires avec des phénotypes de résistance « sauvages » que nosocomiales avec des profils de multirésistance aux antibiotiques. Elles ont été impliquées dans certains cas à des épidémies de diarrhées. Leur traitement nécessite une bonne connaissance des différentes classes d'entérobactéries qui sont caractérisées par des profils de résistance aux antibiotiques différents. Les associations bêta-lactamine plus aminoside ou bêta-lactamine plus fluoroquinolone restent les traitements de référence des infections à entérobactéries (Zogheib 2005).

Les résistances aux antibiotiques chez les entérobactéries diffèrent selon les espèces. Les salmonelles sont habituellement sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à BGN. Pour les salmonelles, le taux global de résistance aux aminopénicillines est actuellement à 12,7% au Sénégal, en décroissance depuis 3-4 ans. Les taux de résistance au cotrimoxazole, à la tétracycline et au chloramphénicol atteignent respectivement 10%, 16% et 5%. Comme pour les aminopénicillines, ces taux sont en décroissance régulière, en particulier pour la tétracycline. Quelques souches résistantes aux quinolones (acide nalidixique) étaient retrouvées ainsi que des souches de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones. Les quinolones sont des molécules efficaces préconisées dans le traitement de multiples maladies infectieuses. En cas de diarrhée, les céphalosporines de 3^e génération et la ciprofloxacine sont les molécules les plus prescrites respectivement chez les enfants et les adultes. L'émergence de la résistance à ces antibiotiques serait due aux utilisations irrationnelles des antibiotiques dans la médecine humaine, mais aussi animale. La résistance aux quinolones a été déjà décrite en Asie et dans quelques pays d'Afrique centrale (Frank 2011). Au Sénégal, il s'agit d'un phénomène nouveau observé pour la première fois chez des souches de shigelles (Sambe-Ba

Discussion

2013). On observe également la circulation de souches porteuses de bêta-lactamase à spectre élargi (Shah 2004). Les souches de *S. Typhi* sont constamment sensibles, *S. Enteritidis* est le sérotype le plus résistant avec une circulation de souches de phénotype ACSuS montrant une résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, aux sulfamides et à la streptomycine. Dans cette étude, les souches de *Salmonella* isolées étaient sensibles aux bêta-lactamines, au chloramphénicol, aux sulfamides et aux céphalosporines. Cependant des souches résistantes à l'acide nalidixique et ayant une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine ont été observées. L'émergence de la résistance à ces antibiotiques serait due aux utilisations irrationnelles des antibiotiques dans la médecine humaine mais aussi animale. Depuis plus d'une décennie, l'utilisation des fluoroquinolones dans le domaine vétérinaire (Piddock 2002), à la fois pour traiter les infections et comme promoteur de croissance permet d'expliquer en partie l'émergence de la résistance. La shigellose continue de poser un important problème de santé publique et elle reste endémique dans de nombreux pays en développement. De toutes les espèces de *Shigella*, *Shigella dysenteriae* type 1 (Sd1) est la plus menaçante en raison de la gravité de la maladie et de son potentiel épidémique. Au Sénégal, *Shigella flexneri* est l'espèce la plus fréquente. Pour les Shigelles, le taux global de résistance aux aminopénicillines se situe entre 30 et 40%. Les taux de résistance au cotrimoxazole, à la tétracycline et au chloramphénicol atteignent respectivement 80%, 95% et 35%. Les souches de *S. dysenteriae* sont constamment résistantes aux pénicillines, chloramphénicol, tétracycline et cotrimoxazole (phénotype ACTS). Ce phénotype est observé pour *S. flexneri* depuis 2001 (30% des souches) reçues au CNSE. Les souches de *S. sonnei* étaient sensibles aux pénicillines mais présentaient une résistance au cotrimoxazole et à la tétracycline. Pour cette espèce, la résistance au chloramphénicol (10%) est d'apparition récente (Gassama-Sow 2010). Le choix des antimicrobiens pour le traitement de la shigellose est devenu limité. La tétracycline, l'ampicilline, le cotrimoxazole et l'acide nalidixique ne sont plus efficaces dans de nombreux pays, en particulier chez les malades infectés par Sd1. Aujourd'hui, il n'est plus recommandé que l'acide nalidixique soit utilisé pour la prise en charge de l'infection par *Shigella* et que la ciprofloxacine devienne le traitement de première intention de la shigellose (OMS 2005). La résistance aux quinolones a été déjà décrite en Asie et dans quelques pays d'Afrique centrale (Frank 2011). C'est un phénomène nouvellement observé au Sénégal et n'a jamais été décrit auparavant.

Les fluoroquinolones (ciprofloxacine, norfloxacine) sont des antibiotiques qui comportent de nombreux avantages : activité plus élevée, moindre résistance, doses et durée du traitement

Discussion

inférieures. Dans les pays où l'acide nalidixique reste efficace, la ciprofloxacine est l'antibiotique de deuxième intention. Cependant, la résistance totale à la ciprofloxacine est probablement accélérée lorsque cet antibiotique est utilisé en 2^e intention contre des souches déjà résistantes à l'acide nalidixique (Zoungrana 2009). Les souches de *Shigella* isolées en Europe restent sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif. Dans les pays en voie de développement particulièrement ceux de la zone intertropicale où les antibiotiques sont en vente libre, les souches de *Shigella* deviennent rapidement multirésistantes. Dans certaines régions, seules les fluoroquinolones demeurent efficaces. L'émergence de souches multirésistantes par acquisition de plasmides est fréquente chez *Shigella*. Les proportions de souches résistantes pour le chloramphénicol, les cyclines ou l'ampicilline varient considérablement selon les zones géographiques. Il n'est pas rare que ce problème concerne jusqu'à 90 % des souches isolées d'une localité.

La surveillance de la résistance de *Shigella flexneri* à l'ampicilline, au cotrimoxazole, à la tétracycline et au chloramphénicol dans les pays subtropicaux est toujours d'actualité. Dans cette étude, les souches étaient dans la majorité résistante au cotrimoxazole, à l'ampicilline et aux tétracyclines. Cette forte multirésistance serait due à une forte pression de sélection antibiotique liée à une utilisation très large de ces antibiotiques au Sénégal, à la vente de ces produits en dehors des structures légales et aussi à une automédication (Gassama-Sow 2010). L'apparition durant ces trois dernières années des résistances aux céphalosporines de 2^{ème} génération et aux fluoroquinolones serait due à une prescription massive et incontrôlée de ces molécules.

Les souches d'*Escherichia coli* sont des commensaux du tube digestif. Normalement saprophytes, certaines souches ont acquis des facteurs de virulence qui les rendent pathogènes. Les résistances aux antibiotiques d'*Escherichia coli* ont déjà été décrites. Il a clairement été établi qu'*E. coli* développe facilement une résistance aux antibiotiques. Les souches sauvages d'*E. coli* sont sensibles à toutes les bêta-lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones. Les résistances d'*E. coli* sont acquises et en milieu hospitalier, elles touchent plus de 50% des souches. Les souches peuvent être productrices de pénicillinases à bas ou haut niveau, de céphalosporinases à bas ou haut niveau, de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) ou d'enzymes d'inactivation des aminosides (Scheftel 2010). Les souches d'entérobactéries BLSE sont distribuées de façon inégale dans le monde. Par exemple, la surveillance des espèces de *Klebsiella pneumoniae* a permis de retrouver les taux de résistances suivants : Amérique latine (45 %), l'Extrême-Orient (25 %), l'Europe (23 %), les États-Unis (8 %) et le Canada (5 %). Les souches de *Proteus mirabilis* et d'*E. coli* produisant

Discussion

une BLSE sont aussi très présentes en Amérique latine. Les résistances de type BLSE se retrouvent souvent associées à des corésistances aux aminoglycosides, aux tétracyclines, au triméthoprime-sulfaméthoxazole et à la ciprofloxacine (Winokur 2001).

Les souches d'*E.coli* responsables de diarrhée sont généralement porteuses de facteurs de virulence. Ces souches sont rencontrées le plus souvent dans les cas de diarrhées chez les enfants de moins de cinq ans (Gassama-Sow 2004). Les souches de *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) sont non invasives mais expriment leur pouvoir pathogène au moyen d'une cytotoxine. Ce sont des souches rarement retrouvées. Dans cette étude, elles ont été retrouvées chez un enfant de moins de 5 ans et chez un adulte. Les *E. coli* entéro-pathogènes ont été plus fréquemment retrouvés dans cette étude. Les EPEC sont des agents fréquents dans les gastro-entérites de l'enfant: 68,1 % chez les enfants au Sénégal (Cissé 1989). Actuellement elles ne sont rencontrées que dans les pays en voie de développement. Dans cette étude, les EaggEC ont été retrouvés uniquement chez les enfants. D'autres études ont démontré leur présence dans des cas de diarrhées aussi bien chez les enfants que chez les adultes mais à un pourcentage plus élevé (Gassama-Sow 2004). Chez les enfants, les diarrhées à EaggEC sont souvent accompagnées de malnutrition sévère (Huang 2007).

Résistances chromosomiques

Le mécanisme chromosomique des résistances bactériennes peut être dû à une mutation spontanée au niveau du génome ou à une recombinaison. La mutation est un changement fortuit dans la séquence des acides nucléiques qui peut transformer la molécule cible d'un antibiotique et rendre l'interaction avec l'antibiotique impossible. Les résistances aux bêtalactamines sont fréquentes chez les entérobactéries. Il a été décrit que les gènes *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}* étaient portés par toutes les espèces d'entérobactéries (Shah 2004; Colodner 2005). Dans cette étude, les gènes *bla_{tem1}* ont été retrouvés principalement chez *E.coli* et *Shigella*. Les souches de *Salmonella* étaient presque toutes sensibles aux bêtalactamines. Les enzymes responsables de cette résistance proviennent d'une dérivée des *tem* par la substitution à différents endroits d'un, de deux ou de trois acides aminés (Bush 2001). Plusieurs types de β -lactamases ont été détectés: *bla_{tem}*, *bla_{shv}*, *bla_{oxa}* comme antérieurement décrits dans d'autres études (Kaye 2004). La première bêtalactamase plasmidique *bla_{tem-1}* a été décrite dans les années 1960. Cette enzyme a été retrouvée dans une souche d'*E. coli* isolée du sang d'un patient en Grèce dont les trois premières lettres du nom étaient TEM (Medeiros 1984). Par le biais d'une transmission plasmidique, cette souche s'est propagée à plusieurs espèces d'entérobactéries. Elle est responsable de près de 80 % des résistances plasmidiques liées à

Discussion

une β -lactamase (Shah 2004). Un autre plasmide, *bla_{shv-1}*, a été retrouvé chez une souche de *E. coli*. En 1988, une étude a permis d'isoler 267 espèces d'entérobactéries productrices de BLSE dérivées de *bla_{TEM}* (*bla_{CTX-1}* ; *bla_{TEM-3}* et *bla_{CAZ-6}*) ou de *bla_{shv}*, *bla_{CAZ-5}*. Depuis les années 1980, les céphalosporines de troisième génération font partie des molécules pivot pour le traitement de plusieurs infections incluant les diarrhées bactériennes. Rapidement, un groupe hétérogène d'enzymes à transmission plasmidique, responsable des résistances aux pénicillines, aux céphalosporines, et autres monobactames s'est développé chez plusieurs espèces bactériennes dont la majorité sont des entérobactéries. Il s'agit des β -lactamases à spectre étendu (Colodner 2005). Les premières observations de BLSE ont été décrites en Europe, puis rapidement aux États-Unis en 1988 où une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis de retrouver une nouvelle β -lactamase à transmission plasmidique chez une *Klebsiella pneumoniae*. Cette enzyme est transmise rapidement et facilement aux autres BGN dont *E. coli* (Quinn 1989). Leur impact est très important, surtout dans les services de réanimation avec de véritables épidémies puis un passage à l'endémie (Paterson 2001). Au Sénégal, une souche de *Klebsiella ozonae* porteuse du gène *bla_{TEM}* a été décrite dans deux cas de sujets présentant une diarrhée (Gassama-Sow 2010). La majorité des BLSE est dérivée des spectres *bla_{TEM-1}* et *bla_{SHV-1}* par substitution d'un acide aminé. Actuellement, il existe plus de 90 types de β -lactamases *bla_{TEM}* et plus de 25 types de β -lactamases *SHV*.

Des nouvelles familles de BLSE ont été décrites plus récemment dans quelques groupes d'entérobactéries: *bla_{CTX-M}*, *bla_{oxa}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* (Bradford 2001). Dans notre étude, nous avons retrouvé ces gènes principalement chez *Shigella* qui portait par ailleurs le gène *bla_{oxa30}* qui dérive du gène *bla_{oxa1}* suite à une mutation au niveau de la séquence d'acides aminés du gène, plus précisément du codon 131 (codon AGA remplacé par le codon GGA : Arg / Gly) (Siu 2000).

En Afrique peu de données sont disponibles ou presque inexistantes concernant la circulation des gènes de résistance aux antibiotiques. L'émergence de la résistance aux céphalosporines de 2^{ème} et 3^{ème} génération durant ces trois dernières années serait probablement due à une prescription massive et incontrôlée de ces molécules.

Détection et caractérisation des intégrons

La recombinaison consiste en un transfert de fragments de gènes d'un endroit du chromosome bactérien à un autre. Si ces fragments sont incorporés à des endroits bien précis, ils sont appelés intégrons, alors que s'ils se déplacent librement, il s'agit de transposons.

Discussion

Les résultats obtenus par la technique de PCR pour la recherche des intégrons montrent que les intégrons de classe 1 occupent une place prédominante avec un pourcentage de 24%, suivi des intégrons de classe 2 et les intégrons de classe 3 ne sont pas représentés. Les intégrons de classe 2 ne représentent que 14% de l'étude avec une absence de gènes *tns*. Ces résultats viennent alors confirmer ceux d'études antérieures qui stipulent que les intégrons de classe 1 sont majoritairement représentés chez les entérobactéries suivi des intégrons de classe 2 (Barlow 2004). L'absence de gènes *tns* chez les intégrons de classe 2 peut s'expliquer par une délétion au cours de l'évolution des souches (Gassama 2008).

La caractérisation des intégrons de classe 1 a permis de détecter trois types de cassettes *dfr* (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*), *bla_{oxa30}*, et *aadA1*. La plupart des intégrons de classe 1 retrouvés étaient délétés de la région 3'. Ce type d'intégron est localisé sur le transposon Tn 404 (Pan 2006).

La caractérisation des intégrons de classe 2 nous a permis de retrouver trois types d'organisation des cassettes: le premier type était l'intégron classique retrouvé sur le transposon Tn7 avec les cassettes *dfrA1-sat-aadA1-orfx* (Hanson 2002). Le deuxième type d'intégron de classe 2 était *dfrA1-sat-aadA1*. Ce type d'intégron a été décrit sur le transposon Tn7 et ses dérivés Tn1826 et Tn4132 (Gassama-Sow 2006). Le troisième type était un intégron de classe 2 sur lequel soit la cassette *aadA1* ou *sat* était délétée ; il est donc probable que cette absence soit momentanée. En effet, il a été démontré que des cassettes de résistance aux antibiotiques peuvent être perdues si elles ne sont pas nécessaires, mais l'intégron peut les garder en mémoire à l'extrémité 3' de l'endroit où elles étaient fixées et dès que la bactérie est réexposée à nouveau à l'antibiotique, la cassette est repositionnée par l'intégrase près du promoteur (Collis 1995). Il a été décrit que la coexistence de ces deux classes d'intégrons laisse supposer qu'ils ont intégré un même gène et confère à ces souches un niveau de résistance élevé (Gassama-Sow 2010).

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être localisés sur le chromosome mais aussi sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons ou les cassettes d'intégrons. Ces éléments peuvent porter plusieurs gènes de résistance et être transférables au sein d'une même espèce mais aussi entre espèces et genres différents. Cette dissémination des gènes de résistance qu'elle soit verticale ou horizontale conduit à l'émergence de bactéries multi résistantes.

Cette partie du travail a fait l'objet de deux publications et de communications orales et affichées

Discussion

Article 1: Sensibilité aux antibiotiques et supports génétiques de la résistance des souches de *Shigella flexneri* isolées à Dakar de 2001 à 2010 (Bulletin de la Société de pathologie exotique May 2013, Volume 106, Issue 2, pp 89-94).

B. Sambe-Ba¹ A. Seck² A.A. Wane¹ N.K. Fall-Niang¹ A. Gassama-Sow¹

1: Unité de Bactériologie Expérimentale et 2: Laboratoire d'Analyses Médicales Institut Pasteur de Dakar, 36, avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Sénégal

Article 2: Emergence of quinolone resistance in *Salmonella* and *Shigella* strains isolated from diarrhoea in Senegal (Journal of Global Antimicrobial Resistance doi:10.1016/j.jgar.2013.06.004).

Sambe-Ba B.^{1*}, Seck A.², Timbine L.G.¹, Wane A.A.¹ and Gassama-Sow A.^{1*}

¹Unité de Bactériologie Expérimentale and ²Laboratoire de Biologie Médicale Institut Pasteur de Dakar

Article 3: Community-acquired diarrhea among children and adults in urban setting in Senegal: clinical, epidemiological and microbiological aspects (**soumis à BMC Infectious Diseases**).

SAMBE-BA Bissoume¹, ESPIÉ Emmanuelle², FAYE Mamadou Elimane¹, TIMBINÉ Lassina Gadi¹, SEMBENE Mbacké³, GASSAMA-SOW Amy^{1,3}

1- Experimental Bacteriology Unit, Pasteur Institute of Dakar, Dakar, Sénégal

2- Epidemiology Unit, Pasteur Institute of Dakar, Dakar, Sénégal

3- University of Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal

Correspondence: Genetic determinants of antibiotic resistance in diarrheagenic *Klebsiella pneumoniae* subspecies *ozaenae*: an emerging enteropathogen in Senegal (Clin Infect Dis. 2010 Feb 1;50(3):453-5. doi: 10.1086/649892.)

Amy Gassama-Sow,¹ Mamadou Hadi Diallo¹ Abdoul Aziz Wane,¹ Abdoulaye Seck,² Bissoum Samb-Ba,¹ Papa Salif Sow,³ and Awa Aïdara-Kane,¹

1: Unité de Bactériologie Expérimentale and 2: Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Pasteur de Dakar, 3: Clinique des Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier Universitaire, Dakar, Sénégal

Communication orale: **GENDRIVAX Salmonella/Meningococcus 2012 Conference** in Nairobi, Kenya, on December 9-10th, 2012. GENDRIVAX

Discussion

Poster 1: **P5 Infectious diarrheal in Senegal and gut microbiota study** (Annual Young Researchers Scientific Meeting 2011, 8-10 November Paris-France).

Sensibilité aux antibiotiques et supports génétiques de la résistance des souches de *Shigella flexneri* isolées à Dakar de 2001 à 2010

Sensitivity to antibiotics and genetic support to resistance of *Shigella flexneri* strains isolated in Dakar from 2001 to 2010

B. Sambe-Ba · A. Seck · A.A. Wane · N.K. Fall-Niang · A. Gassama-Sow

Reçu le 11 novembre 2012 ; accepté le 12 février 2013
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2013

Résumé Cent quatre vingt-dix (190) souches de *Shigella flexneri* provenant du Centre national sénégalais des entérobactéries sis à l'Institut Pasteur de Dakar, isolées entre 2001 et 2010 ont été étudiées. L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par antibiogramme. La détection et la caractérisation des intégrons et des gènes de résistance a été faite par amplification génique en utilisant des amorces spécifiques et séquençage. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré des taux de résistance élevés vis-à-vis des cyclines 95 %, du cotrimoxazole 60 %, de l'ampicilline 55 %. Dix-neuf souches résistaient aux céphalosporines (10 %). Deux souches étaient résistantes aux quinolones et une souche résistait à l'imipénème. L'étude du support génétique de ces résistances a permis de détecter les gènes *tetB*, *dfr*, *cat*, *bla_{tem1}*, *bla_{oxa30}*, *bla_{shv}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. Les intégrons de classe 1 étaient majoritaires suivis des intégrons de classe 2. Les cassettes *bla_{oxa30}*, *aadA1/aadA2*, *dfrA1*, *dfrA7* ont été retrouvées sur les intégrons de classe 1. Les intégrons de classe 2 présentaient trois types d'organisation de cassettes. Aucun intégron de classe 3 n'a été détecté. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré, qu'en plus des résistances classiques observées chez les souches de *S. flexneri*, des résistances vis-à-vis des céphalosporines de 3^e génération et des fluoroquinolones émergent. Ces molécules doivent être utilisées avec prudence dans le traitement des shigelloses.

Mots clés Intégron · Multirésistant · *Shigella flexneri* · Hôpital · Dakar · Sénégal · Afrique intertropicale

Abstract Diarrheal diseases remain a leading cause of death with 14.7 million deaths in 2001 and 26% of global

mortality worldwide according to WHO. *Shigella* species are prevalent in tropical areas; they are present all the year, with epidemic outbreaks in rainy season. Between 2001 and 2010 one hundred ninety (190) strains of *Shigella flexneri* isolated from National Senegalese Enterobacteriaceae Center located at the Pasteur Institute in Dakar were studied. Susceptibility was performed by antibiogram following the CASFM recommendations. Detection and characterization of integrons and resistance genes was done by PCR using specific primers and sequencing. Antibiotic susceptibility showed high percentage resistance to tetracycline: 95%, cotrimoxazole 60%, ampicillin 55%. Nineteen strains were cephalosporin resistant (10%). Two isolates were resistant to quinolones and one was imipenem resistant. Genes *tet*, *dfr*, *cat*, *bla_{tem1}*, *bla_{oxa30}*, *bla_{shv}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* were detected on isolates. Integrons harbored genes resistance. The class 1 integron predominated followed by class 2 integron. Genes *bla_{oxa30}*, *aadA1/aadA2*, *dfrA1*, *dfrA7* were found on class 1 integron. Class 2 integron showed three different types cassettes. No class 3 integron was detected. Genes *dfrA1*, *dfrA7*, *sat*, and *aadA1* were harbouring by integrons. Antibiotic susceptibility showed that *Shigella flexneri* strains are resistant to the first line drugs used to treat shigellosis in Senegal. Resistance to 3rd generation of cephalosporins and fluoroquinolones emerged and is of great concern. These molecules must be used with caution in the treatment of shigellosis.

Keywords Integron · Multidrug resistant · *Shigella flexneri* · Hospital · Dakar · Sénégal · Sub-Saharan Africa

Introduction

Les shigelloses sont répandues dans toutes les régions du globe, mais elles sévissent à l'état quasi-endémique dans

B. Sambe-Ba · A. Seck · A.A. Wane · N.K. Fall-Niang · A. Gassama-Sow (✉)
Institut Pasteur de Dakar, 36, avenue Pasteur,
BP 220, Dakar, Sénégal
e-mail : gassama@pasteur.sn

les régions intertropicales (Asie du Sud-Est, Afrique équatoriale, occidentale et Amérique centrale). Selon l'OMS, environ 250 millions de cas de shigellose sont déclarés annuellement causant 600 000 décès [21]. En Afrique, 15 pays connaissent des flambées de shigellose qui touchent 30 % de la population et 50 % des enfants [21]. En Afrique subsaharienne, les infections à *Shigella* occupent une place prépondérante dans les étiologies des diarrhées et gastroentérites : elles représentent 46 % au Gabon [2], 42 % au Burkina-Faso, 13 % au Mali. Au Sénégal, les infections à *Shigella* s'observent chez les patients de tout âge, mais le plus grand nombre de cas concerne les enfants de 1 à 5 ans [28]. A Dakar, les shigelles représentent 24,8 % des agents entéropathogènes et 4,3 % des causes de diarrhées [6]. *S. flexneri* est l'espèce la plus fréquente dans les pays en développement [22] ; elle est responsable de la forme endémique de la maladie, alors que *Shigella dysenteriae* sérotype 1 cause des épidémies brutales. Cette espèce réputée très virulente engendre des symptômes graves à l'origine du fort taux de mortalité. La première vague d'épisodes épidémiques de *Shigella dysenteriae* sérotype 1 signalée en Afrique a été notée dans la région des Grands Lacs en 1993-1994, suivie de l'épidémie de Côte d'Ivoire en 1998 [2]. L'espèce *Shigella sonnei* est prévalente dans les pays industrialisés [18]. Dans les pays en développement, l'épidémiologie de *Shigella* s'est modifiée au cours de cette dernière décennie. Ainsi, au Sénégal, on note une prédominance de *Shigella flexneri*, aussi bien en zone rurale qu'en zone urbaine [6], tandis que *Shigella dysenteriae* est en recul. *Shigella flexneri* apparaît le plus souvent résistant à tous les antibiotiques dits de première ligne : ampicilline, tétracycline, triméthoprim-sulfaméthoxazole, chloramphénicol [7]. L'acide nalidixique et la ciprofloxacine constituent à ce jour les antibiotiques recommandés pour le traitement des shigelloses chez l'adulte [16]. Cependant, on note une résistance croissante des souches de *Shigella flexneri* aux antibiotiques fréquemment prescrits à Dakar [23]. Cette résistance peut être liée à l'acquisition de plasmides ou de nouveaux éléments génétiques appelés intégrons. Les intégrons sont des éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques. Ils sont constitués d'une région 5' conservée contenant un gène *intI* qui code une intégrase, d'une région variable qui héberge une ou plusieurs cassettes et d'une région 3' qui n'est pas présente chez toutes les classes d'intégrons. Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison de site spécifique médié par une intégrase [25,29].

L'objectif de cette étude est d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. flexneri* isolées sur une période de dix ans, de rechercher et de caractériser les supports génétiques des résistances observées.

Matériels et méthodes

Souches bactériennes

Notre étude a porté sur 190 souches de *Shigella flexneri* isolées entre 2001 et 2010 (109 souches de 2001 à 2003, 34 souches de 2004 à 2006, 26 souches de 2007 à 2008 et 21 souches de 2009 à 2010) provenant du Centre national sénégalais des entérobactéries (CNSE) sis à l'Institut Pasteur de Dakar.

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CASFM 2010) [3].

Les critères d'interprétation ont été déterminés en mesurant les diamètres d'inhibition de la souche testée et suivant les normes du CASFM.

Extraction d'ADN génomique

Il s'agit d'une extraction chimique utilisant un kit (Qiamp DNA Mini Kit Cat. 51304 Qiagen) prêt à l'emploi. C'est une méthode rapide et fiable. L'ADN obtenu est visualisé sur gel d'agarose à 1 % avant d'être conservé à -20°C.

Détection des gènes de résistance

A partir des différents phénotypes observés, des gènes de résistance ont été recherchés. Il s'agit des gènes *bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{SHV}* codant la résistance aux aminopénicillines, *bla_{CTX-M}* codant la résistance aux céphalosporines, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* et *bla_{IMP}* codant la résistance aux carbapénèmes, *tet* codant la résistance aux tétracyclines, *cat* au chloramphénicol [17], *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* [12] codant la résistance aux fluoroquinolones.

L'amplification génique s'est faite dans un thermocycleur (2720 thermal Cycler Applied Biosystems). La mise en évidence des amplicons a été réalisée après migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1 %.

Détection et caractérisation des intégrons

La détection des intégrons a été réalisée par la technique d'amplification génique [25] avec des amorces spécifiques des gènes de l'intégrase des différentes classes d'intégrons 1, 2 et 3. La caractérisation des intégrons de classe 1 a été réalisée par amplification génique et par séquençage [10]. Le séquençage a été fait avec le protocole Big Dye terminator sur le séquenceur ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyser et la recherche d'homologie des séquences réalisée grâce au

programme de recherche BLASTN et BLASTX au National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

La caractérisation des intégrons de classe 2 a été faite essentiellement par amplification génique de la région variable de l'intégron, ce qui a permis d'identifier les différentes cassettes.

Résultats

Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité a montré que les souches avaient des taux de résistance différents vis-à-vis des antibiotiques. Les bactéries étaient résistantes principalement à la tétracycline (95 %), au chloramphénicol (61 %) et au cotrimoxazole (52 %). Les souches présentaient des taux de résistance élevés aux aminopénicillines (55 %). Certaines d'entre elles étaient résistantes aux céphalosporines de 2^e et 3^e génération mais à de faibles pourcentages (Fig. 1). Nous avons noté des résistances aux quinolones, aux fluoroquinolones (deux souches isolées en 2008 et en 2010) et aux carbapénèmes (une souche résistante à l'imipénème isolée en 2009). Trois grands phénotypes de résistance ont été observés (Tableau 1).

Une augmentation du nombre de souches résistantes a été notée de 2001 à 2007 avec des pics en 2004, 2005 et 2006. En 2007, il y a une diminution de la résistance des souches au chloramphénicol et à l'ampicilline. De 2009 à 2010, on note une résistance élevée et stable au cotrimoxazole et une diminution de la résistance au chloramphénicol (Fig. 2). A partir de 2007, la diminution de la résistance aux antibiotiques classiques pourrait être due aux faibles effectifs annuels de souches de *Shigella flexneri* obtenus.

Détection des intégrons

Sur les 190 souches étudiées, 131 avaient un intégron soit un pourcentage de 69 %, avec une majorité d'intégrons de classe 1 (55,2 %). Les intégrons de classe 2 ont été détectés chez 24 souches soit un pourcentage de 12,6 %. Quatorze souches hébergeaient à la fois les intégrons de classe 1 et 2 et représentaient un pourcentage de 7,4 % ; cependant nous avons noté des souches multirésistantes et chez lesquelles aucun intégron n'a été détecté (29 %). Aucun intégron de classe 3 n'a été détecté.

Détection des gènes de résistance

L'analyse des antibiogrammes a permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de souches résistantes à la tétracycline, au chloramphénicol, aux pénicillines, aux aminosides, aux céphalosporines de 2^e et 3^e générations. Les

gènes *bla_{oxa30}*, *bla_{tem1}* et *bla_{shv}* codant la résistance aux aminopénicillines ont été retrouvés chez 86 % des souches. Le gène du groupe *bla_{CTX-M1}* a été retrouvé chez 4 % des souches. Deux souches hébergeant à la fois les gènes *bla_{CTX-M1}* et *bla_{KPC}* codant respectivement la résistance aux céphalosporines de 2^e et 3^e générations et aux carbapénèmes ont fait leur apparition en 2010. Une souche isolée en 2009 était résistante à l'imipénème et les gènes *bla_{CTX-M1}*, *bla_{KPC}* et *bla_{IMP}* étaient retrouvés sur cette souche en plus du gène *dfrA7* porté par l'intégron de classe 1. Le gène *bla_{VIM}* n'a pas été retrouvé. Le gène *cat* codant la résistance au chloramphénicol a été retrouvé chez 45 souches (24 %). Les gènes *tetB* ont été retrouvés chez 107 souches soit un pourcentage de 56 %. Les gènes *tetA*, *tetC*, *tetG* n'ont pas été retrouvés. Les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* ont été retrouvés chez les deux souches résistantes aux quinolones. Par contre les gènes *qnr* et *qep* codant la résistance par transfert plasmidique n'ont pas été retrouvés. La caractérisation des intégrons de classe 1 a permis d'identifier les gènes *bla_{oxa30}*, *aadA1/aadA2*, *dfr* (*dfrA1*, *dfrA7*) codant la résistance aux aminopénicillines, à la streptomycine et spectinomycine et au triméthoprime. Pour les intégrons de classe 2 nous avons retrouvé trois types : l'intégron de classe 2 classique (*dfrA1-sat-aadA1-orfX*), et deux autres types d'intégrons avec des délétions de la cassette *aadA1* ou *sat* (Tableau 1).

La cassette *dfrA1* a été retrouvée en majorité dans les intégrons. Les cassettes *dfrA1* et *aadA1* étaient retrouvées aussi bien chez les intégrons de classe 1 que de classe 2.

Discussion

La surveillance de la résistance de *Shigella flexneri* à l'ampicilline, au cotrimoxazole, à la tétracycline et au

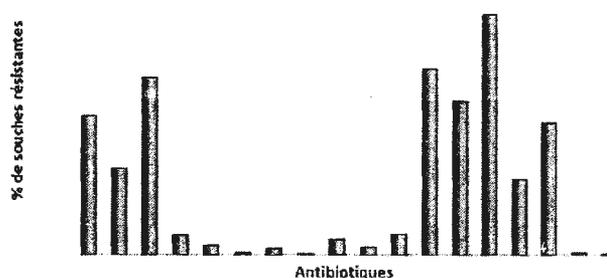


Fig. 1 Profil de résistance des souches de *Shigella flexneri* vis-à-vis des antibiotiques testés / Resistance profile of *Shigella flexneri* strains in regard to tested antibiotics AM : ampicilline ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : ticarcilline ; CEF : céfotaxime ; FOX : céfoxitine ; CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime ; IMP : imipénème ; AN : amikacine ; GM : gentamicine ; TM : tobramycine ; S : streptomycine ; C : chloramphénicol ; TE : tétracycline ; SSS : sulfamides forts ; SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole ; NA : acide nalidixique ; CIP : ciprofloxacine

Tableau 1 Résultat du phénotype de résistance, type d'intégrons et gènes de résistance / *Result of resistance phenotype, type of integrons and resistance genes.*

Nombre de souches (N)	Phénotype de résistance	Gène <i>intI</i> région 5'CS	Région 3'CS (taille en pb)	Déterminants génétiques de la résistance	
				Intégrons	Gènes de résistance
N= 49	AM ^R AMC ^R TIC ^R sss ^R SXT ^R TE ^R	<i>Int1</i>	700	<i>dfrA7</i>	<i>bla_{oxa30}</i> , <i>aadA1</i> ,
N= 92	AM ^R TE ^R C ^R	<i>Int1</i>	700	<i>dfrA1-sat- aadA2-orfx</i>	<i>bla_{tem1}</i>
N= 13	AM ^R AN ^R TM ^R GM ^R	<i>Int1</i>	700	<i>dfrA1</i>	<i>bla_{oxa30}</i> , <i>aadA1</i>
N=11	AM ^R CEF ^R FOX ^R CTX ^R CAZ ^R	<i>Int1</i>	700	<i>dfrA1-sat-aadA2</i>	<i>tetB</i> , <i>catA1</i>
N=8	AM ^R CEF ^R FOX ^R CTX ^R CAZ ^R	<i>Int1</i>	700	<i>dfrA1</i>	<i>bla_{tem1}</i> , <i>bla_{shv}</i>
N=1	AM ^R AMC ^R TIC ^R IMP ^R	<i>Int1</i>	700	<i>dfrA1</i>	<i>aadA2</i> , <i>bla_{tem1}</i>
N=2	sss ^R SXT ^R TE ^R S ^R C ^R	<i>Int2</i>	2500	<i>dfrA7</i>	<i>bla_{oxa30}</i> , <i>aadA1</i> ,
N=1	AM ^R AMC ^R TIC ^R NA ^R CIP ^R	<i>Int2</i>	2500	<i>dfrA1-sat- aadA2-orfx</i>	<i>bla_{tem1}</i> , <i>bla_{CTX-M1}</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{IMP}</i>
N= 11	AM ^R AMC ^R TIC ^R sss ^R SXT ^R TE ^R C ^R S ^R TM ^R GM ^R	<i>Int1, Int2</i>	2500	<i>dfrA1-sat- aadA2-orfx</i>	<i>tetB</i> , <i>catA1</i>
N= 11	AM ^R AMC ^R TIC ^R sss ^R SXT ^R TE ^R C ^R S ^R TM ^R GM ^R	<i>Int1, Int2</i>	2500	<i>dfrA1-sat- aadA2-orfx</i>	<i>gyrA</i>
N= 11	AM ^R AMC ^R TIC ^R sss ^R SXT ^R TE ^R C ^R S ^R TM ^R GM ^R	<i>Int1, Int2</i>	2500	<i>dfrA1-sat- aadA2-orfx</i>	<i>bla_{tem1}</i> , <i>catA1</i>

^R: phénotype résistant ; *Int1*: intégron de classe 1 ; *Int2*: intégron de classe 2 ; Colonne intégrons : *dfrA1*, *dfrA7*, *sat*, *aadA2*, *orfx*: gènes portés par les intégrons (séquençage des cassettes) ; Colonne gènes de résistance : gènes non portés par les intégrons et présents chez *Shigella flexneri* (PCR classique).

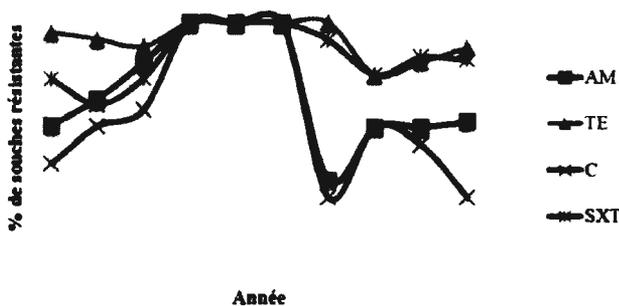


Fig. 2 Évolution de la résistance des souches de *Shigella flexneri* vis-à-vis des antibiotiques les plus utilisés / *Evolution of the resistance of Shigella flexneri strains in regard to the most commonly used antibiotics*

chloramphénicol dans les pays subtropicaux est toujours d'actualité. L'étude des phénotypes de résistance a permis d'identifier des souches pentarésistantes pour la plupart à l'instar de ce qui est observé dans les autres parties du monde [5]. Nous avons aussi retrouvé des souches non résistantes. Les souches étaient en majorité résistantes au cotrimoxazole, à l'ampicilline et aux tétracyclines. Cette forte multirésis-

tance serait due à une forte pression de sélection antibiotique liée à une utilisation très large de ces antibiotiques au Sénégal, à la vente de ces produits en dehors des structures légales et aussi à une automédication anarchique [10]. Quatre vingt quinze pour cent des souches étaient résistantes à la tétracycline. Seul le gène *tetB* était retrouvé. Il a été décrit que les gènes *tetB* étaient prédominants chez les entérobactéries [15]. La résistance simultanée à plusieurs antibiotiques, en particulier l'ampicilline, le chloramphénicol, la tétracycline, et la streptomycine a déjà été décrite chez *Shigella*. Une étude réalisée en Tanzanie a montré que la résistance à l'ampicilline est généralement due à la présence du gène *bla_{oxa-1}* [20]. Dans notre étude, nous avons retrouvé le gène *bla_{oxa30}* qui dérive du gène *bla_{oxa1}* suite à une mutation au niveau de la séquence d'acides aminés du gène, plus précisément du codon 131 (codon AGA remplacé par le codon GGA : Arg / Gly) [27]. L'émergence de la résistance aux céphalosporines de 2^e et 3^e génération et aux fluoroquinolones ces trois dernières années serait due à une prescription massive et incontrôlée de ces molécules. Les résultats du séquençage ont montré des mutations chromosomiques uniquement au niveau du gène *gyrA*. Ces mutations seraient à l'origine de ces résistances [19]. Il n'y a pas eu de mutations

au niveau des gènes *gyrB*, *parC* et *parE*. Il a été décrit que les mutations de ces gènes chez les entérobactéries étaient rares [12]. Les quinolones sont des molécules efficaces préconisées dans le traitement de multiples maladies infectieuses. En cas de diarrhée, les céphalosporines de 3^e génération et la ciprofloxacine sont les molécules les plus prescrites respectivement chez les enfants et les adultes. L'émergence de la résistance à ces antibiotiques serait due aux utilisations irrationnelles des antibiotiques dans la médecine humaine, mais aussi animale.

Depuis plus d'une décennie, l'utilisation des fluoroquinolones dans le domaine vétérinaire [24] à la fois pour traiter les infections et comme promoteur de croissance expliquerait en partie l'émergence de la résistance. La résistance aux quinolones a été déjà décrite en Asie et dans quelques pays d'Afrique centrale [9]. Au Sénégal, il s'agit d'un phénomène nouveau observé pour la première fois chez des souches de shigelles. Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être localisés sur le chromosome, mais aussi sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons ou les cassettes d'intégrons. Les intégrons de classe 1 étaient prédominants avec un pourcentage de 55,2 % et les souches de *Shigella flexneri* porteuses de l'intégron *intl1* disposaient d'une extrémité 3' conservée. Les intégrons de classe 2 étaient faiblement représentés avec un pourcentage de 12,6 %. Nous n'avons pas détecté d'intégrons de classe 3. Ces résultats viennent confirmer ceux d'études antérieures qui montrent que les intégrons de classe 1 sont majoritairement représentés chez les entérobactéries suivi des intégrons de classe 2 [1,10]. Des souches multirésistantes chez lesquelles aucun intégron n'a été détecté ont été retrouvées (24 %). Ces souches étaient résistantes à l'ampicilline, à la tétracycline et au cotrimoxazole. Les intégrons sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques des souches de *Shigella flexneri*, mais la présence des souches résistantes dépourvues d'intégron laisse supposer qu'il existe d'autres mécanismes de dissémination de la résistance [26]. La caractérisation des intégrons de classe 1 a permis de détecter trois types de cassettes : *df^r* (*df^rA1* et *df^rA7*), *bla_{oxa30}* et *aadA1/aadA2* retrouvées chez les autres espèces de *Shigella* [9,11]. Des intégrons de classe 1 délétés de la région 3' étaient largement retrouvés (34 souches) ; la plupart d'entre eux étaient associés aux intégrons de classe 2. Ce type d'intégron est localisé sur le transposon Tn 404 [13]. Les intégrons de classe 2 présentaient trois types d'organisation de cassettes : le premier type était l'intégron classique retrouvé sur le transposon Tn7 avec les cassettes *df^rA1-sat-aadA1-orfX* [14]. Le deuxième type d'intégron de classe 2 était *df^rA1-sat-aadA1* ; il a été retrouvé chez 25 % des souches. Ce type d'intégron a été décrit sur le transposon Tn7 et ses dérivés Tn1826 et Tn4132 [11]. Le troisième type était un intégron de classe 2 sur lequel soit la cassette *aadA1* ou *sat* était délétée ; il est donc probable que cette absence soit momentanée et dès que la bactérie est réexposée à nouveau à l'antibiotique, la cassette

est repositionnée par l'intégrase près du promoteur [4]. Quarante souches hébergeaient à la fois des intégrons de classe 1 et 2. Il a été décrit que la coexistence de ces deux classes d'intégrons laisse supposer qu'ils ont intégré un même gène et confère à ces souches un niveau de résistance élevé [10]. Chez les souches hébergeant les intégrons de classe 1 et 2, la cassette *aadA1* était retrouvée sur les deux intégrons.

Conclusion

Les résistances sont multiples chez les souches de *Shigella flexneri* et concernent différentes classes d'antibiotiques. Les souches, dans leur majorité (90 %) sont résistantes aux antibiotiques de première ligne utilisés dans le traitement des diarrhées. L'étude des supports génétiques de la résistance aux antibiotiques montre que les intégrons sont largement représentés et jouent un rôle important dans la dissémination de la résistance chez *Shigella flexneri*. La présence des gènes *df^r* et *aadA1*, *cat1*, *bla_{oxa30}*, *bla_{tem1}*, *bla_{shv}*, *tet* montre que les souches sont résistantes à des classes d'antibiotiques variées. La forte multirésistance vis-à-vis de la tétracycline et du cotrimoxazole permet de conclure que ces classes d'antibiotiques ne doivent plus être utilisées dans le traitement de la shigellose au Sénégal. Les quinolones et les céphalosporines restent efficaces dans le traitement des diarrhées, mais l'émergence de la résistance observée au cours de cette étude est préoccupante et nécessite une utilisation rationnelle de ces antibiotiques.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt et reconnaissent tous avoir participé pleinement à ce travail.

Références

1. Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS (2004) Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 48(3):838–42
2. Bonfiglio G, Simporé J, Pignaletti S, et al (2002) Epidemiology of bacterial resistance in gastro-intestinal-pathogens in a tropical area. *Int J Antimicrob Agents* 20(5):387–9
3. Cavallo JD, Chardon H, Chidiac C, et al (2010) Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
4. Collis CM, Hall RM (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 39(1):155–62
5. DeLappe N, O'Halloran F, Fanning S, et al (2003) Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from Western Ireland, an area of low incidence of infection. *J Clin Microbiol.* 41(5):1919–24
6. Diallo A, Diop MB, Guèye MM, Etard JF (2001) Investigation d'une épidémie de shigellose en zone rurale au Sénégal. *Cahiers Santé* 11:217–9

7. Dromigny JA, Nabeth P, Juergens-Behr A, Perrier-Gros-Claude JD (2005) Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Dakar, Senegal. *J Antimicrob Chemother* 56(1):236–9. Epub 2005 May 12
8. Dubois V, Parizano MP, Arpin C, et al (2007) High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother* 51(4):1333–40. Epub 2007 Jan 22
9. Frank T, Mbecko JR, Misatou P, Monchy D (2011) Emergence of quinolone resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the Central African Republic: genetic characterization. *BMC Res Notes* 4:309
10. Gassama-Sow A, Aidara-Kane A, Barraud O, et al (2010) High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates. *J Infect Dev Ctries* 4(4):207–12.
11. Gassama-Sow A, Diallo MH, Boye CS, et al (2006) Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal. *Int J Antimicrob Agents* 27(3):267–70. Epub 2006 Feb 7
12. Gunell M, Webber MA, Kotilainen P, et al (2009) Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 53(9):3832–6. Epub 2009 Jul 13.
13. Hall RM, Collis CM (1998) Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat* 1(2):109–19
14. Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH (2002) IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* 184(6):1712–21.
15. Hartman AB, Essiet II, Isenbarger DW, Lindler LE (2003) Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of tet(A)-1. *J Clin Microbiol* 41(3):1023–32
16. Haukka K, Siitonen A (2008) Emerging resistance to newer antimicrobial agents among *Shigella* isolated from Finnish foreign travellers. *Epidemiol Infect* 136(4):476–82. Epub 2007 Jun 20
17. Jacoby GA, Munoz-Price LS (2005) The new β -lactamases. *N Engl J Med* 352(4):380–91
18. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al (1999) Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 77(8):651–66
19. Lunn AD, Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, Vila J (2010) Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates. *Int Microbiol* 13(1):15–20
20. Navia MM, Capitano L, Ruiz J, et al (1999) Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania, Tanzania. *J Clin Microbiol* 37(10):3113–7
21. OMS (1997) *Weekly Epidemiology Records*. 72:73–8
22. Pan JC, Ye R, Meng DM, et al (2006) Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *J Antimicrob Chemother* 58(2):288–96. Epub 2006 Jun 9
23. Perrier Gros-Claude JD, Dromigny JA, et al (2002), Centre National Sénégalais des Entérobactéries. Rapport d'activité. 22-5.
24. Piddock LJ (2002) Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev* 26(1):3–16
25. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T (2000) Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 44(10):2684–8
26. Roy PH (1997) Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. *Médecine Sciences* 13(8-9): 927–933
27. Siu LK, Lo JY, Yuen KY, et al (2000) β -Lactamases in *Shigella flexneri* isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel oxa-1-Like β -Lactamase, oxa-30. *Antimicrob Agents Chemother* 44(8):2034–8
28. Sow AI, Cisse MF, Deggla C, Samb A (1992) Bactériologie des shigelles isolées dans un CHU en zone tropicale. *Dakar Méd* 37(2):127–30.
29. Stockes HW, Hall RM (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3(12):1669–83

Emergence of quinolone resistance in *Salmonella* and *Shigella* strains isolated from diarrhea in Senegal.

Sambe-Ba B.^{1*}, Seck A.², Timbine L.G.¹, Wane A.A.¹ and Gassama-Sow A.^{1*}

¹Unité de Bactériologie Expérimentale and ²Laoratoire de Biologie Médicale Institut Pasteur de Dakar

***Corresponding author:**

Bissoume Sambe-Ba

E-mail: bsambe@pasteur.sn

Dr Amy Gassama-Sow

36, Avenue Pasteur Dakar Sénégal

BP 220

Tel: +221 338399235

Fax: +221 338399236

E- mail: gassama@pasteur.sn

Author affiliations

Sambe-Ba Bissoume, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar

bsambe@pasteur.sn

Seck Abdoulaye, Unité de Biologie Médicale Institut Pasteur de Dakar

seck@pasteur.sn

Timbine Lassina Gadi, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar

las_timbin@yahoo.fr

Wane Abdoul Aziz, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar

awane@pasteur.sn

Gassama Sow Amy, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar

gassama@pasteur.sn

1 Sir,

2 Diarrheas are a significant public health problem in developing countries. In Senegal, diarrhea
3 is the leading cause of death among both children and adults. Bacteria such as *Salmonella* spp,
4 *Shigella* spp and *Escherichia coli* have been mainly incriminated [1]. Antibacterial agents are
5 often recommended for treatment of suspected shigellosis and invasive salmonellosis. WHO
6 recommend fluoroquinolones as first-line antibiotics used in the treatment of diarrhea.

7 Fluoroquinolones are very active on a wide range of pathogenic species and were
8 recommended to be used as first line drug to treat diarrheal diseases in Senegal and were also
9 introduced into veterinary medicine for treatment of poultry against enteric pathogens [2]. The
10 treatment of bacterial infections diarrhea is increasingly complicated by the ability for
11 bacteria to develop antimicrobial resistance.

12 A prospective study was conducted between march, 2009 and november, 2010 in nine health
13 centers of three regions of Senegal. Three hundred two (302) stools samples were collected
14 from infants and adults with diarrhea. All subjects underwent complete physical examination
15 and history of the disease (including antibiotic intake in the 15 previous days) was recorded.
16 The protocol was approved by the National Ethical Committee of Senegal (SEN25/07) and
17 written informed consent was obtained from all patients.

18 Stools culture was done routinely to identify *Salmonella* and *Shigella*. Antibiotic
19 susceptibility was performed by disk diffusion method according to the standards
20 Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM) [3]. Strains were
21 tested against the following antimicrobial disks (Biorad): ampicillin (10µg), amoxicillin-
22 clavulanate (20µg/10µg), (cefoxitin (30µg), cefalothin (30µg), ceftazidime (30µg), imipenem
23 (10µg), nalidixic acid (30µg), flumequin (30µg), ciprofloxacin (5 µg)chloramphenicol (30µg),

24 , trimethoprim (5µg), sulfonamides (30µg), trimethoprim-sulfamethoxazole
25 (1.25µg/23,75µg), , tetracycline (30UI), streptomycin (30µg), gentamicin (10UI),. The
26 minimal inhibitory concentrations (MICs) of nalidixic acid and ciprofloxacin for all nalidixic
27 acid resistant isolates were determined by E-test (Biomerieux France). DNA was extracted
28 using a kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations and stored at -20°C.
29 PCR for the amplification of quinolone resistance determining regions (QRDR) (*gyrA*, *gyrB*,
30 *parC*, and *parE*) [4] and the plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) *qnrA*, (*qnrB*,
31 *qnr*, *qepA* [4] and *aac(6')-Ib* [4] were performed with primers described elsewhere. PCR
32 products were cloned with the pGEM-T vector system (Promega, Madison, WI, USA),
33 transformed into XL1-Blue competent cells (Stratagene, Garden Grove, CA, USA).
34 Nucleotide sequencing was performed in both directions with the same PCR primers used for
35 the amplification of the target genes in an automatic sequencer (ABI Prism 3100; Applied
36 Genetic Biosystems). Contig sequences were edited with Chromas Pro and compared in
37 BLAST of the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST>).
38 A total of 18 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (serovars Enteritidis (n=6),
39 Typhimurium (n=3), Typhi (n=2), Hillingdon (n=1), Chile (n=1), Miami (n=1), Poona (n=1),
40 Somone (n=1), Putten (n=1), Nima (n=1) and 30 *Shigella (flexneri* (n=24), *sonnei* (n=4),
41 *dysenteriae A2* (n=1), *boydii* (n=1), were isolated. Antimicrobial susceptibility testing
42 revealed that four *S. Enteritidis* and one *S. Hillingdon* (10%) were nalidixic acid resistant
43 ($MIC_S \geq 256 \mu\text{g/ml}$). One *Salmonella* Enteritidis nalidixic acid resistant was also resistant to
44 betalactams (2%). All these *Salmonella* were isolated from adults. Among the thirty *Shigella*
45 strains, only one *Shigella flexneri* strain (2%), isolated from a child one year old, showed
46 multi-resistance to nalidixic acid ($MIC \geq 256 \mu\text{g/ml}$) and betalactam ($MIC_S \geq 32 \mu\text{g/ml}$). All
47 the nalidixic acid resistant isolates showed reduced susceptibility to ciprofloxacin (MIC_S :
48 0.94-1.9 µg/ml).

49 Results showed that *gyrB*, *parC* and *parE* genes were found in all resistant nalidixic acid
50 isolates. The *gyrA* gene was found only in *Shigella flexneri* isolate. The gene *qnr* supposed to
51 be worn by integrons and the *qep* gene encoding the efflux pump had not detected in this
52 study. The *aac (6)-Ib* gene was present in *Shigella flexneri* and this strain was also resistant
53 to beta-lactams. Sequencing results showed that none of the common mutations associated
54 with fluoroquinolone resistance in the QRDR of the *gyrB*, *parC* or *parE* genes were detected
55 in isolates. However, *Shigella flexneri* strain possessed a mutation in *gyrA* at position 87 with
56 substitution Asp⁸⁷ to Thr⁸⁷.

57 It should be noted that in Senegal, *Salmonella* and *Shigella* are the first bacteria implicated in
58 infectious diarrheas. WHO recommends using quinolones along with oral rehydration to treat
59 diarrheal diseases. They are highly effective molecules and act on a wide range of bacteria.

60 According to the recommendation of CA-SFM, nalidixic acid is a marker of quinolone
61 resistance in *Salmonella*; strains that were resistant to this antibiotic were also resistant to
62 other quinolones. Mutations in *gyrB*, *parC*, and *parE* are extremely rare among quinolone-
63 resistant *Salmonella* [5].

64 This is the first study in Senegal describing resistance to quinolone in *Salmonella* and *Shigella*
65 *flexneri* clinical isolates. Quinolone resistance had been describing on *Shigella sonnei* isolate
66 in Senegal [6]. The increasing quinolone resistance among *Salmonella* and *Shigella* isolates is
67 of actual concern. The wide use of quinolones in human medicine is likely to contribute to
68 this phenomenon.

References

- 69 1. Gassama-Sow A, Sow PS, Guèye M, N'diaye AG, et al, Characterization of
70 pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in
71 Senegal. *Journal of Infectious Diseases*, 2004. **189**: p. 75-8.

- 72 2. Cardinale E, Dromigny J A, Tall F, Ndiaye M, et al, Fluoroquinolone susceptibility of
73 *Campylobacter* strains, Senegal. *Emerging Infectious Diseases*, 2003. **9**: p. 1479-81.
- 74 3. Cavallo J, Chardon H, Chidiac C, Choutet P et al, Comité de l'Antibiogramme de la
75 Société Française de Microbiologie. 2010.
- 76 4. Piddock L, Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans
77 and food animals. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002. **26**: p. 3-16.
- 78 5. Haugum K, Aas L, Lindstedt BA, Effect of quinolone antibiotics and chemicals on
79 mutation types in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar and Virchow.
80 *Journal of Chinese Clinical Medicine*, 2007. **2**: p. 241–251.
- 81 6. Sire JM, Macondo EA, Perrier-Gros-Claude JD, et al, Antimicrobial resistance in
82 *Shigella* species isolated in Dakar, Senegal (2004-2006). *Journal of Infectious*
83 *Diseases*, 2008. **61**: p. 307-309.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Senegalese Ministry of Higher Education (FIRST: Fond d'Impulsion pour la Recherche Scientifique et Technologique).

Transparency declarations

None to declare.

Correspondence

Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in Diarrheagenic *Klebsiella pneumoniae* Subspecies *ozaenae*: An Emerging Enteropathogen in Senegal

TO THE EDITOR—Diarrheal diseases are common in developing countries. They are usually caused by bacteria like *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Vibrio cholerae*. Members of the genus *Klebsiella* are found as normal flora in the human intestinal tract; some strains are considered to be enteropathogenic and are able to cause diarrhea both in immunocompetent and immunocompromised individuals [1, 2]. Although this pathogen is responsible for diarrhea, the molecular mechanism of its pathogenesis remains unclear. Virulence factors including fimbriae, iron uptake systems, lipopolysaccharide, capsular serotype, and toxins involved in the pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* have been found on horizontally acquired DNA regions, such as pathogenicity islands, plasmids, transposons, and bacteriophages [3, 4]. Horizontal transmission of genes among bacteria, including antimicrobial resistance genes, can also occur via transduction, transformation, or conjugation.

We report here the genetic determinants of resistance and virulence in diarrheagenic *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* isolated in Senegal. We isolated 2 strains of *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* from adults with diarrhea in 2 hospitals in Dakar, one an urban hospital and the other a university teaching hospital–based infectious diseases clinic. The first isolate was obtained in January 1998 from a human immunodeficiency virus–negative person, the second in May 2000 from a human immunodeficiency virus type 1–infected patient with a CD4 lymphocyte count

<200 cells/mm³. These subjects were randomly selected to be part of a case-control study. *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* was considered to be the sole etiologic agent of diarrhea because it was obtained as a pure culture in nonselective, solid, bromocresol-purple. Strains were identified with the API 20E system (Biomérieux). Antibiotic susceptibility was tested by disc diffusion method, according to Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations.

Strains were resistant to amoxicillin (minimum inhibitory concentration [MIC], 128 µg/mL), amoxicillin-clavulanic acid (MIC, 64 µg/mL), ticarcillin (MIC, 256 µg/mL), trimethoprim-sulfamethoxazole (MIC, 256 µg/mL), tetracycline (MIC, 256 µg/mL), chloramphenicol (MIC, >8 µg/mL), ofloxacin (MIC, 64 µg/mL), and ciprofloxacin (MIC, 64 µg/mL). No extended-spectrum β-lactamases were detected. This resistance towards the first-line (tetracyclines and trimethoprim-sulfamethoxazole) and the second-line drugs (quinolones) and the absence of an extended-spectrum β-lactamase allow the use of broad-spectrum cephalosporins to treat diarrheal illness in these cases.

DNA was extracted using a kit (Qiagen), according to the manufacturer's recommendations, and was stored at –20°C. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection antimicrobial resistance genes and integrons was performed with primers described elsewhere (GenBank accession numbers AB187515, FJ616991, AY070235, and X53796) [5–8]. *bla_{TEM}*, *cat1*, *tetB*, and *qnrS* genes encoding ampicillin, chloramphenicol, tetracycline, and quinolone resistance, respectively, were present in all strains. Both strains hosted class 1 and class 2 integron. The characterization of class 1 integron revealed an atypical cassette array with an insertion sequence,

oxa30-aadA1-IS1. In class 2 integrons, the organization of cassette arrays revealed the same 3 cassettes as were found in Tn7 (*dfrA1-sat1-aadA1-orfX*). The 3' segment was absent in class 2 integrons. The atypical class 1 integron (*oxa30-aadA1-IS1*) was described in the *Shigella* resistance locus in the chromosome, as demonstrated in other strains of *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* with worldwide origins [9, 10]. The presence of the same integron content in *Shigella* species suggests that *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* isolates may have acquired the atypical class 1 integron by horizontal transfer with other resistance determinants; specifically conjugative transfer, which requires cell-to-cell contact, making gene flux easier in the gastrointestinal tract.

To determine whether the resistance determinants were transferable, we performed a conjugative experiment on selective medium containing nalidixic acid (50 µg/mL) plus trimethoprim (100 µg/mL). All antimicrobial drug resistances were transferred at once from *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* to an *E. coli* strain resistant to nalidixic acid. Plasmid analysis revealed that the isolates and transconjugants contained a single plasmid of >100 Kb. The PCR analysis of plasmid DNA and transconjugants confirmed the transfer of all resistance genes and class 1 and class 2 integrons, suggesting the plasmidic location of these resistant determinants.

This is the first description of *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* associated with diarrhea in Senegal. Guerin et al [2] reported a case of bloody diarrhea cause by *K. pneumoniae* but did not find virulence genes and presented the possibility of the presence of new virulence genes. The ferric dicitrate uptake system (*fec*) in *Shigella* species is known to play an important role in bacterial virulence [11]. To

determine whether the ferric dicitrate transport system (*fec*) was involved in *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae* virulence, we successfully performed PCR with use of primers described by Pan et al [9]. Because all relevant markers of the *Shigella* resistance locus pathogenicity island were present in *K. pneumoniae* subspecies *ozaenae*, we thought that a horizontal gene transfer, a process that is well known to contribute to microbial evolution, could have possibly occurred between *Shigella* and *K. pneumoniae*.

Acknowledgment

Potential conflicts of interest. All authors: no conflicts.

Amy Gassama-Sow,¹ Mamadou Hadi Diallo,¹ Abdoul Aziz Wane,¹ Abdoulaye Seck,² Bissoum Samb-Ba,¹ Papa Saïf Sow,³ and Awa Aïdara-Kane^{1,*}

¹Unité de Bactériologie Expérimentale and ²Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Pasteur de Dakar, ³Clinique des Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier Universitaire, Dakar, Sénégal

References

1. Nguyen Thi PL, Yassibanda S., Aïdara A, Le Bouguenec C, Germani Y. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:135–137.
2. Guerin F, Le Bouguenec C, Gilquin J, Haddad F, Goldstein FW. Bloody diarrhea caused by *Klebsiella pneumoniae*: A new mechanism of bacterial virulence? *Clin Infect Dis* 1998; 27: 648–649.
3. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:589–603.
4. Hacker J, Bloom-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H. Pathogenicity islands and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 1997; 23:1089–1097.
5. Guadabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and in vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol* 2000; 49:929–936.
6. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization on integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2684–2688.
7. Ohtsubo H, Ohtsubo E. Nucleotide sequence of an insertion sequence, IS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:615–619.
8. White P, McIver C, Rawlison W. Integrons and gene cassettes in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2658–2661.
9. Pan JC, Ye M, Meng DM, Zang W, Wang HQ, Lui KZ. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:288–296.
10. Dubois V, Parizano MP, Arpin C, Coulanges L, Beziau MC, Quentin C. High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1333–1340.
11. Luck SN, Turner SA, Rajakumar K, Sakellaris H, Adler B. Ferric dicitrate transport system (*fec*) of *Shigella flexneri* 2a YSH6000. *Infect Immun* 2001; 69:6012–6021.

* Present affiliation: World Health Organization, Food Safety and Zoonoses, Health Security and Environment, Geneva, Switzerland.

Reprints or correspondence: Dr Amy Gassama-Sow, Unité de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur de Dakar, 36, Avenue Pasteur BP 220, Dakar, Sénégal (gassama@pasteur.sn).

Clinical Infectious Diseases 2010;50:453–5

© 2010 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. 1058-4838/2010/5003-0027\$15.00
DOI: 10.1086/649892



Samb Bissoume Ba¹, Wane Abdoul Aziz¹, Ly Alioune Badara³, Seck Abdoulaye², Fenollar Florence⁴, Raoult Didier⁴ and Gassama Sow

Amy¹
Unité de Bactériologie Expérimentale and ²Unité de Biologie Médicale, Institut Pasteur de Dakar

bsambe@pasteur.sn

Institut de Recherche pour le Développement Dakar

URMITE CNRS IRD 6236 Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de la Méditerranée Aix Marseille II, Marseille, France.

Introduction

Diarrhoeal diseases are common in developing countries. They are usually caused by bacteria in both adults and children and mostly by viruses in children under 5 years old. In Senegal, infectious diarrheas are commonly caused by gram-negative bacilli transmitted by food, water or by faecal-oral route. Even though antibiotics are still efficient in the treatment of diarrheal diseases, resistance to antibiotics is increasing in enteric bacteria^[1]. Standards bacterial cultures are long and very expensive, in addition in many care centers in our country methods are not standardized. MALDI-tof mass spectrometry technical revolution is useful for rapidly detecting bacteria.^[2]

Objective

The aim of the study was to identify enteric pathogens agents responsible for diarrhea and characterize antibiotics resistance patterns on isolates.

Material and methods

Stool samples received from 302 patients (adults and infants) with gastroenteritis and 200 of control patients during the period March 2009 - November 2010 were studied. Fecal samples were collected from seven health centers in Dakar and its suburbs and two regional hospitals (Thiès and Diourbel) in Senegal. Stools culture was done by classical techniques used routinely in laboratory. Antimicrobial susceptibility was performed by disk diffusion on Mueller Hinton agar, according to the recommendations of the « CASFM 2010 » www.sfm-microbiologie.org. Genes resistance (*gyrA*, *gyrB*, *parE*, *parC*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *aac(6)-ib-cr*) were searched on enteropathogenic bacteria isolates. For viruses, two methods were used: the Vitek Adeno-Rota kit and Electronic Microscopy. For detecting parasites: MIF, Baleinger, Veber, Kinyoun techniques were used. Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex, Bruker Daltonics) with the flex control software (Bruker Daltonics) a potential tool for the identification of bacteria in routine microbiology was used in this study for detecting all bacteria species. A score value > 1.9 was considered for identification at the species level as previously described. If the score value < 1.9, colonies were analyzed by 16S rRNA PCR followed by sequencing for detecting new species.

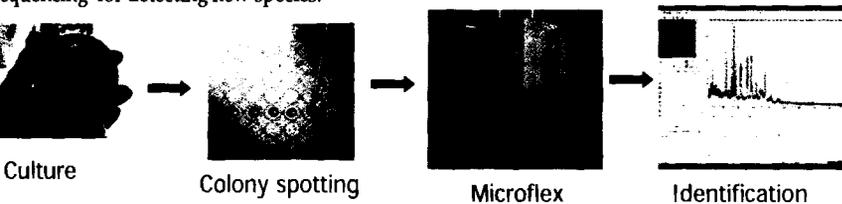


Table 1: Bacteria groups detected by maldi-tof

Bacteria Groups	Number of species	Bacteria Identification (score)	
		Genus	Species
Staphylococcus	8	2,7	3
Lactobacillus	11	3	2,9
Streptococcus	18	3	3
Enterococcus	15	2,8	3
Bacteroides	13	2	1,98
Clostridium	26	2,5	2
Bacillus	31	1,99	1,97
Enterobacteriaceae	21	3	3
Others groups	66	1,99	1,89

Results and discussion

Many parasites 169/302 (55.9%), virus 75/302 (24.8%) and bacteria 237/302 (73.5%) were isolated on diarrheal stools. Viruses were mostly detected in children and diarrhea frequently caused by rotavirus. Bacteria were more predominant in fecal samples. By classical culture, were isolated *Salmonella* subspecies enterica (n=18) including *S. Typhi* (n=2), *Shigella flexneri* (n=24), *S. sonnei* (n=4) and 1 *S. dysenteriae* A2, 1 *Aeromonas sobria*, *Escherichia coli* (53.3% average proportion of total detectable bacteria) were predominant and 35.3% of them had at least one resistance gene. Members of the genus *Klebsiella* were found in diarrheal stools. In controls patients, parasites were highly isolated but we have 1 *Shigella flexneri* isolated in control stool. Susceptibility testing showed resistance to ampicillin, first-generation cephalosporin, sulfonamides, sulfamethoxazole-trimethoprim in all pathogenic bacteria studied. One strain of *Shigella flexneri* was imipenem resistant. The prescription of imipenem is restricted at the hospital level. Strains were most susceptible to third-generation cephalosporin and piperacillin-tazobactam. Nalidixic acid resistant was observed (24.4%) in *Escherichia coli*, five *Salmonella* and one *Shigella flexneri* strains (table 2). In Senegal this is the first description of quinolone resistance in *Shigella* isolates. By mass spectrometry culture MALDI-TOF, 219 bacteria were correctly identified with scores >1.9 and 3 new species detected by rRNA 16S in genera *Staphylococcus*, *Clostridium* and *Bacillus*. *Bacillus* and *Clostridium* were groups mostly described in faeces followed by *Enterococcus* and Enterobacteriaceae (table1). Species identified were described in five phyla. The Firmicutes were widely found in all stools 160 (72%) followed by Proteobacteria 17% and Bacteroidetes 6.8%. Fusobacteria and Actinobacteria were poorly detected (figure 1).

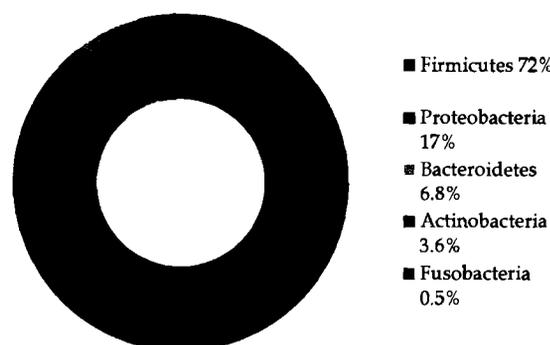


Figure 1: Repartition of bacteria in phyla

Conclusions

Our preliminary results showed that nalidixic acid resistance is increasing among *Salmonella* and merged with *Shigella* clinical isolates in Senegal. Imipenem is occurring in the treatment of diarrhea cases. Standard bacterial culture is long and very expensive and not always standardized in some areas of our country due to the lack of laboratory. MALDI-TOF mass spectrometry may be useful for quickly detecting bacteria isolates, viruses and fungi. However the expense of using MALDI-Tof MS for identification lies in the acquisition of the machine (cost and reagents). In Senegal it should be taken a monitoring system for prevention of epidemics diarrhea and have an algorithm of data for their etiology.

References

Gassama Sow A, A.-K.A., Barraud O, Gatet M, Denis F, Ploy M C, High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in *Shigella* and *2 integrons in Senegalese Shigella spp isolates*. J Infect Dev Ctries May 2010. 4 (4): p. 207-212.

Ng P et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry *Clin Inf Dis* 2009

Table 2: Nalidixic gene resistance studied

Name of strains	Genes						
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parE</i>	<i>parC</i>	<i>qnr</i>	<i>qep</i>	<i>Aac(6)-ib-cr</i>
<i>Salmonella</i> Hillingdon (n=1)	-	+	-	+	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis (n=3)	-	+	-	+	-	-	-
<i>Salmonella</i> Essen (n=1)	-	+	+	+	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> (n=1)	+	+	+	+	-	-	+

-: no present gene

+: present gene

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale et Perspectives

Les maladies diarrhéiques sont devenues endémiques dans les pays en voie de développement. La vente et l'utilisation anarchique des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire accentuent la pression de sélection des souches résistantes. Dans cette étude nous avons vu que la plupart des souches diarrhéiques étudiées étaient résistantes à au moins cinq antibiotiques. Pour la première fois, nous avons trouvé et décrit des souches de *Salmonella* et de *Shigella flexneri* résistantes aux quinolones. Aujourd'hui avec les nouvelles techniques de biologie moléculaire, il est possible de typer les souches de *Salmonella* sans passer par le PFGE, par la méthode CRISPR consistant à effectuer une PCR classique sur deux gènes. La résistance bactérienne aux quinolones est désormais une réalité au Sénégal. Au vu de ces résultats, il s'avère nécessaire de mettre en place un centre de référence pour le suivi et l'évaluation des résistances bactériennes dans les pays en voie de développement en général et au Sénégal en particulier. Le phénotype de résistance fourni par l'antibiogramme doit orienter le traitement de première intention mais reste insuffisant pour maîtriser les résistances bactériennes et leur évolution. Les structures traitantes devraient éviter les traitements probabilistes sans aucune confirmation biologique. L'utilisation abusive et incontrôlée des antibiotiques exerce une pression de sélection antibiotique et l'émergence de bactéries multi résistantes. Il est possible que dans l'avenir, la résistance s'étend pour d'autres antibiotiques et à d'autres souches commensales comme nous l'avons vu avec *Klebsiella ozaena* qui héberge des intégrons alors qu'auparavant elle n'en avait pas. Avec l'endémicité des diarrhées bactériennes, et la pression de sélection des bactéries, les souches multi résistantes deviennent prédominantes dans le tube digestif et accroissent ainsi la propagation de bactéries pathogènes dans l'environnement. A travers le Programme National de Lutte contre les Infections Nosocomiales (PRONALIN) et ses démembrements dans les structures sanitaires sous la forme de Comité de Lutte Contre les Infections Nosocomiales (CLIN), la mise en place d'un réseau de surveillance de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est l'un des objectifs prioritaires du Ministère de la Santé et de l'Action Sociale du Sénégal. Il faudra très rapidement démarrer ces activités et les coordonner pour mettre en place un réseau national et même sous régional pour mieux contrôler ces résistances. Il faudra aussi que le Sénégal intègre le réseau Africhol (Réseau africain de surveillance du choléra) qui regroupe actuellement neuf pays africains: Cameroun, République démocratique du Congo (RDC), Côte d'Ivoire, Guinée, Kenya, Mozambique, Tanzanie, Togo, Ouganda pour mutualiser les efforts dans la lutte contre le choléra.

En Afrique subsaharienne, l'identification spécifique des bactéries s'avère très compliquée en raison de la faiblesse des techniques utilisées. La coproculture a toujours été mise en œuvre

Conclusion générale et Perspectives

pour l'identification bactérienne. Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un outil puissant et potentiel pour l'identification bactérienne de routine en Afrique qui permet une identification rapide des espèces bactériennes. Pendant longtemps, le coût élevé de l'appareil et le manque de réactifs spécifiques ont limité le développement de la technologie. Les frais d'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification se trouvent maintenant dans l'acquisition d'une machine qui coûte entre 100.000€ et 200.000€. Récemment, le coût a été évalué à 135.000 euros pour le système Microflex de Brücker. Le temps de l'identification a été récemment amélioré jusqu'à 1 minute en utilisant le système Microflex et 46 secondes pour le Vitek-MS de bioMérieux. Par ailleurs, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a aussi le potentiel pour l'identification au niveau du sérotype et le profilage de la résistance aux antibiotiques en quelques minutes. Ainsi, l'identification rapide et précise des espèces bactériennes rencontrées régulièrement est justifiée pour améliorer les soins aux patients atteints de maladies infectieuses. Cette technique va être une bonne alternative pour l'identification bactérienne en Afrique. En effet, le coût principal est basé sur l'investissement pour acheter l'appareil. Les Réactifs sans date d'expiration, sans exigence spécifique pour leur stockage, et qui ne sont pas chers peuvent être utilisés. Enfin, le protocole qui a impliqué directement des colonies bactériennes déposées sur la plaque du spectromètre de masse MALDI-TOF, quel que soit le support à base de gélose, sans aucune sous-culture ou de la préparation de la colonie est très simple et peut être largement utilisé. Dans l'ensemble, la spectrométrie de masse MALDI-TOF est un outil puissant potentiel pour l'identification bactérienne de routine en Afrique, car elle permet d'identifier rapidement les espèces bactériennes, y compris celles qui sont rares et difficiles à identifier par des méthodes phénotypiques. La prochaine étape consistera à implanter la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans les hôpitaux africains comme cela s'est déjà fait avec l'implantation du Vitek-MS au laboratoire de biologie de l'Hôpital Principal de Dakar. L'identification des mycobactéries de la tuberculose, des arthropodes vecteurs de pathogènes ou le test direct des hémocultures ou des urines par MALDI-TOF seraient d'un apport bénéfique pour l'avancée de la recherche médicale

au

Sénégal.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Adachi J, Ericsson CD, Jiang ZD, DuPont MW, Pallegar SR, DuPont HL (2002). "Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico " Journal of Infectious Diseases **185**: 1681-1683.
- Ahmed A, Nakano H, Shimamoto T (2005). "Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **55**: 371-374.
- Aïdara A, Arborio M, Samb A, Diop-Mar I, Boye C, Diop BM (1988). "Incidence des *Escherichia coli* pathogènes sur les diarrhées aiguës infantiles à Dakar." Bulletin de la Société de Pathologie Exotique **81 (2)**: 202-210.
- Aïdara A, Gentile B (1989). "Etiologies bactériennes des diarrhées aiguës infantiles à Dakar." Dakar Médical **34 (1-4)**: 157-160.
- Allos B (2001). "*Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends " Clinical Infectious Diseases **32 (8)**: 1201-1206.
- Amann R, Wolfgang L, Karl-Heinz S (1995). "Phylogenetic identification and In situ detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiological Reviews **59 (1)**: 143-169.
- Aminu M, Esona MD, Geyer A, Steele AD (2008). "Epidemiology of rotavirus and astrovirus infections in children in Northwestern Nigeria." Annals of African Medicine **7 (4)**: 168-174.
- Anane S, Attouchi H, Kaouech E, Belhadj S, et al (2010). "Caractéristiques épidémiologiques et cliniques de la microsporidiose intestinale chez les immunodéprimés vus à Tunis." Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé **20 (1)**: 21-29.
- Andersson A, Lindberg M, Jakobsson H, Backhed F, Nyren P, Engstrand L (2008). "Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing." PLoS One **3 (7)**: e2836.
- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Lot H, et al (1995). "A novel integron carrying the metallo-β lactamase gene *bla-IMP*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **39**: 1612-1615.
- Ashrafus S, Jinath S, Phung DC, Mwansa JC, kong RYC (2008). "*Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains, Asia and Africa." Emerging Infectious Diseases **14(6)**.
- Aubry P (2004). "Shigellose et dysenterie bacillaire." Actual.
- Aubry P (2012). Diarrhées infectieuses. Actualités 2011.
- Avril JL, Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. (1999). "Les *Shigella*." Bactériologie Clinique 3ème édition: 138.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JF, Peterson DA, Gordon JI (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." Science **307**: 1915-1920.
- Balamurugan R, Janardhan HP, George S, Raghava MV, Muliylil J, Ramakrishna BS (2008). "Molecular studies of fecal anaerobic commensal bacteria in acute diarrhea in children." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **46(5)**: 514-519.
- Barker A, Clark CA, Manning PA (1994). "Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1." Journal of Bacteriology: 5450-5458.
- Barlow R, Pemberton JM, Desmarchelier Patricia M et al (2004). "Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48 (3)**: 838-842.
- Berche P, Gaillard JL, Simonet M (1991). Les bactéries des infections humaines. E. Flammarion, Médecine et Sciences: 660.
- Bercion R, Njuimo SP, Boudjeka PM, Manirakiza A (2008). "Distribution and antibiotic susceptibility of *Shigella* isolates in Bangui, Central African Republic." Tropical Medicine and International Health **13 (4)**: 468-471.

Références bibliographiques

- Biskri L, Mazel D (2003). "Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47** (10): 3326-3331.
- Bonfiglio G, Simporé J, Pignaletti S, Musumeci S, Solinas ML (2002). "Epidemiology of bacterial resistance in gastro-intestinal-pathogens in a tropical area." International Journal of Antimicrobial Agents **20**: 387-389.
- Bradford P (2001). "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." Clinical Microbiology Review **14**: 933-951.
- Brooks J, Ochieng JB, Kumar L, Okoth G, et al (2006). "Surveillance for bacterial diarrhea and antimicrobial resistance in rural western Kenya, 1997-2003." Clinical Infectious Diseases **43** (4): 393-401.
- Brown A, Rankin SC, Platt DJ (2000). "Detection and characterization of integrons in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis." FEMS Microbiology Letters **191**: 145-149.
- Burrus, V., Waldor MK (2003). "Control of SXT integration and excision." Journal of Bacteriology **185**(17) 5045-5054.
- Bush K (2001). "New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy." Clinical and Infectious Diseases **32**: 1085-1089.
- Cani P, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R (2008). "Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding." Pathology Biology **56** (5): 305-309.
- Carattoli A (2001). "Importance of integrons in the diffusion of resistance." Veterinary Research **32** (3-4): 243-259.
- Cardinale E, Dromigny J A, Tall F, Ndiaye M, et al (2003). "Fluoroquinolone susceptibility of *Campylobacter* strains, Senegal." Emerging Infectious Diseases **9**: 1479-1481.
- Carraturo A, Catalani V, Tega L (2008). "Microbiological and epidemiological aspects of Rotavirus and enteric Adenovirus infections in hospitalized children in Italy." New Microbiologica **31**: 329-336.
- Cavallo J, Chardon H, Chidiac C, Choutet P et al (2010). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- Cissé F, Ouangre RA, Gaye A, Boye C, Sow AI, et al (1989). "Causes des gastro-entérites infectieuses de l'enfant à Dakar." Presse Médicale **18** (37).
- Coker A, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL (2002). "Human campylobacteriosis in developing countries." Emerging Infectious Diseases **8** (3): 237-244.
- Collis C, Hall RM (1992). "Genes cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles." Molecular Microbiology **6**: 2875-2885.
- Collis C, Hall RM (1995). "Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **39** (1): 155-162.
- Collis C, Mi-jurmg K, Stokes HW, Hall RM (2002). "Integron-encoded Int1 integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site recombination with a *59-be* site." Molecular Microbiology **46** (5): 1415-1427.
- Collis C, Recchia GD, Mi-jurmg K, Stockes HW, Hall RM (2001). "Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase Int1." Journal of Bacteriology **183** (8): 2525-2542.
- Collis, C. M., Hall, RM. (1992). "Genes cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles." Molecular Microbiology **6**: 2875-2885.
- Colodner R (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists." American Journal of Infection Control **33**: 104-107.

Références bibliographiques

- Correia M, Grosso F, Salgado LM, Lito J, Mendo MCS (2003). "Molecular characterization a new class 3 integron in *Klebsiella*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**: 2838-2843.
- Courvalin P, Trieu CP (1997). "Plasmides et transposons de résistance aux antibiotiques." Medecine Sciences: 316-331.
- Crump J, Youssef FG, Luby SP, Wasfy MO, Rangel JM, Talaat M, et al (2003). "Estimating the incidence of typhoid fever and other febrile illnesses in developing countries." Emerging Infectious Diseases **9**: 539-544.
- Curtis R, Fenwick RG, Goldshmidt R et al (1997). "The mechanism of conjugation in *S. Mutsuhashi*, transferable drug resistance factor." Tokyo University Press: 109-134.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, et al (2010). "Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa." PNAS **107 (33)**: 14691-14696.
- De la Cruz E, Garcia LJM (1993). "Secondary sites for integration mediated by the Tn21 integrase." Molecular Microbiology **10**: 823-828.
- Derougemont A, Kaplon J, Billaud G, Lina B, et al (2009). "Sensitivity and specificity of the VIKIA Rota-Adeno immuno-chromatographic test (BioMérieux) and the Elisa IDEIA Rotavirus kit (Dako) compared to genotyping." Pathologie Biologie **57 (1)**: 86-89.
- Derouin F (2009). "Épidémiologie de la cryptosporidiose humaine en France en 2006 et 2007: données du réseau Cryptosporidies Anofel." Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire 8-11.
- DeSantis T, Brodie EL, Moberg JP, Zubietta IX, Piceno YM, Andersen GL (2007). "High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment." Microbiology Ecology **53 (3)**: 371-383.
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA (2008). "The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing." Plos Biology **6 (11)**: 2383-2400.
- Diallo A, Diop, M.B., Guèye, M.M., Etard, J.F. (2001). "Investigation d'une épidémie de shigellose en zone rurale au Sénégal." Cahier Santé **11**: 217-219.
- Didier E, Weiss LM (2006). "Microsporidiosis: current status." NIH Public Access **19 (5)**: 485-492.
- Eckburg P, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M et al (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science **308 (5728)**: 1635-1638.
- Fmch M, Ali M, Yunus M (2008). "Risk areas and neighborhood-level risk factors for *Shigella dysenteriae* 1 and *Shigella flexneri*." Health Place **14 (1)**: 96-105.
- Engberg J, Aarestrup M, Taylor DE, Smidt-Gerner P, Nachamkin I (2001). "Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates." Emerging Infectious Diseases **7 (1)**: 24-34.
- Euzéby JP (2007). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, <http://www.bacdico.net>
- Fernandez-Olmos A, Morosini MI, Lamas A, Garcia-Castillo M, Garcia-García L, Canton R, et al (2012). "Clinical and microbiological features of a cystic fibrosis patient chronically colonized with *Pandoraea sputorum* identified by combining 16S rRNA sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry." Journal of Clinical Microbiology **50(3)**: 1096-1098.
- Ferron (1989). Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. E. C. e. R. 13ème édition: 290-293.
- Finegold S, Attebery HR, Sutter VL (1974). "Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets." American Journal of Clinical Nutrition **27(12)**: 1456-1469.

Références bibliographiques

- Fleury H (1999). Classification des virus. Abrégés de Virologie humaine Masson: 14-19.
- Fluit A, Shmitz FJ (1999). "Class 1 integrons, genes cassettes, mobility, epidemiology." European Journal of Microbiology and Infectious Diseases **18**: 761-770.
- Fodha I, Chouikha A, Dewar J, Trabelsi A, et al (2007). "Prévalence des antigènes d'adénovirus chez les enfants atteints de diarrhée aiguë." Medecine Tropicale **67**: 256-258.
- Frank T, Mbecko JR, Misatou P, Monchy D (2011). "Emergence of quinolone resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the Central African Republic: genetic characterization." BioMed Central Research Notes **4**: 309.
- Freney, J., Renaud F, Hansen W, Bollet C, Megraud F (2000). Campylobacter, in Précis de Bactériologie Clinique.
- Gassama-Sow A, Aidara-Kane A, Barraud O et al (2010). "High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates." Journal of Infection in Developing Countries **3 (4)**: 207-211.
- Gassama-Sow A, Diallo MH, Boye CS, Garin B et al (2006). "Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal." International Journal of Antimicrobial Agents **27**: 267-270.
- Gassama-Sow A, Diallo MH, Wane AA, Seck A, Samb-Ba B, Sow PS and Aidara-Kane A (2010). Genetic determinants of antibiotic resistance in diarrheagenic *Klebsiella Pneumoniae* subspecies *ozaenae*: an emerging enteropathogen in Senegal. **50**.
- Gassama-Sow A, Sow PS, Guèye M, N'diaye AG, et al (2004). "Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal." Journal of Infectious Diseases **189**: 75-78.
- Gassama A, Sow PS, Fall F, Camara P, et al (2001). "Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus." International Journal of Infectious Diseases. **5 (4)**: 192-198.
- Gassama-Sow A, Diallo MH, Gatet M, Denis F et al (2008). "Description of an unusual class 2 integron in *Shigella sonnei* isolates in Senegal (sub-Saharan Africa)." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **62** 843-851.
- Gault E, Chikhi-Brachet R, Delon S, Schnepf N, et al (1999). "Distribution of human rotavirus G types circulating in Paris, France, during the 1997–1998 epidemic: high prevalence of type G4." Journal of Clinical Microbiology **37**: 2373-2375.
- Gendrel D, Treluyer JM, Richard LD (2003). "Parasitic diarrhea in normal and malnourished children." Fundamental and Clinical Pharmacology **17**: 189-197.
- Gill S, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al (2006). "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome." Science **312 (5778)**: 1355-1359.
- Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J (1990). "Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies." Review of Infectious Diseases. **12 (1)**: 41-50.
- Guerrant RL, Kosek M, LimacAA, Lortz B, Guyatt HL (2002). "Updating the DALYs for diarrhoeal disease." Trends in Parasitology **18**: 191-193.
- Hans S, Perch M, Dias F, Thea KF, Peter A, Kåre M, Halvor S (2002). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections and diarrhea in a cohort of young children in Guinea-Bissau." Journal of Infectious Diseases **186 (12)**: 1797-1807.
- Hanson K, Sunström L, Pelletier A, Roy PH (2002). "IntI2 Integron Integrase in *Tn7*." Journal of Bacteriology **184**: 1712-1721.

Références bibliographiques

- Hill J, Peters JC (1998). "Environmental contributions to the obesity epidemic." Science **280**: 1371-1374.
- Hochhut B, Beaber JW, Woodgate R, Waldor MK (2001). "Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site." Journal of Bacteriology **183** (4): 1124-1132.
- Huang D, et al (2007). "Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries." Journal of Medical Microbiology **56**: 1386-1392.
- Hugenholtz P, Hooper SD, Kyrpides NC (2009). "Focus: Synergistetes." Environmental Microbiology **11**(6): 1327-1329.
- Huse S, Dethlefsen L, Huber JA, Mark WD, Relman DA, Sogin ML (2008). "Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing." PLoS Genetics **4** (11): e1000255.
- Imbert P (2001). "Prise en charge des diarrhées aiguës de l'enfant en milieu tropical." Medecine Tropicale **61**: 226-230.
- Ismail H, Anthony MS, Tau NP, Sooka A, Keddy KH (2013). "Cholera outbreak in South Africa, 2008–2009: Laboratory analysis of *Vibrio cholerae* O1 strains." Journal of Infectious Diseases **208**: 39-45.
- Kaye K, Gold HS, Schwaber MJ, et al (2004). "Variety of beta-lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the northeastern United States." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**: 1520-1525.
- Kholodii G, Mindin S, Mayya P, Svetlana M (2003). "*Tn5060* from the Siberian permafrost is most closely related to the ancestor of *Tn21* prior to integron acquisition." FEMS Microbiology Letters **226**: 2551-2555.
- Kopke B, Wilms R, Engelen B, Cypionka H, Sass H (2005). "Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients." Applied and Environmental Microbiology **71**(12): 7819-7830.
- Kotloff KL, Winickoff J P, Ivanoff B, Clemens J D et al. (1999). "Global burden of *Shigella* infectious: implications for vaccine development and implementation of control strategies." World Health Organization **77** (8): 651-666.
- La Scola B, Pagnier I, Million M, Trape JF, Raoult D (2010). "Missing giant viruses in stools: the Marseillevirus paradigm." Submitted to Nature.
- Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, et al (2012). "Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study." Clinical Microbiology Infection.
- Lagier JC, El KK, Nguyen TT, Armougom F, Raoult D, Fournier PE (2012). "Non-contiguous finished genome sequence and description of *Anaerococcus senegalensis* sp. nov." Standards in Genomic Sciences **6**(1): 116-125.
- Leclercq R, Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C (2000). *Sensibilité aux antibiotiques*. Paris.
- Lee S, Sung J, Lee J, Ko G (2011). "Comparison of the gut microbiotas of healthy adult twins living in South Korea and the United States." Applied Environmental Microbiology **77**(20): 7433-7437.
- Lewis B (1992). "Genes III." 590-603.
- Ley R, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." Nature **444** (7122): 1022-1023.
- Mandomando I, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, et al (2008). "Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **76** (3): 522-527.

Références bibliographiques

- Manga N, Ndour CT, Diop SA, Dia NM, Ka-Sall R, Diop BM, Sow AI, Sow PS (2008). "Le choléra au Sénégal de 2004 à 2006: les enseignements d'épidémies successives." Médecine Tropicale **68**: 589-592.
- Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, Jones ME (1999). "Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **43** (3): 686-689.
- Mayaka Ma-Nitu S (2001). Etude épidémiologie de la bilharziose à *Schistosoma mansoni* en milieu scolaire: cas du groupement de Kiyanka, Université Kongo. **Thèse de doctorat en médecine, chirurgie et accouchement**.
- Mazel D, Dychinco B, Webb V, Davies J (1998). "A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome." Science **280**: 605-608.
- McKenna P, Hoffmann C, Minkah N, Aye PP, Lackner A, Liu Z et al (2008). "The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis." PLoS Pathogen **4** (2): e20.
- Medeiros A (1984). "Beta-lactamases." Br Med Bull **40** 18-27.
- Mishra A, Lagier JC, Rivet R, Raoult D, Fournier PE (2012). "Non-contiguous finished genome sequence and description of *Paenibacillus senegalensis* sp. nov." Standards in Genomic Sciences **7**(1): 70-81.
- Nachamkin I, Engberg J, Aarestrup F. (2000). "Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species." Press, Washington DC.
- Nataro J, Kaper JB (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clinical Microbiological Review **11** (1): 142-201.
- Ngwe E, Antoine B, Banza NN (2007). Les déterminants socio-environnementaux de la morbidité diarrhéique des enfants de moins de 5 ans en milieu urbain au Cameroun : les villes d'Ebolowa et Maroua. Rapport Final de Recherche.
- Nietieman L, Nordgren J, Ouermi D, Dianou D, et al (2011). "Burden of rotavirus and other enteropathogens among children with diarrhea in Burkina Faso." International Journal of Infectious Diseases **15** (9): 646-652.
- O'Halloran F, Lynche M, Cryan B, O'Shea H, et al (2000). "Molecular Characterization of Rotavirus in Ireland: Detection of Novel Strains Circulating in the Population." Journal of Clinical Microbiology **38** (9): 3370-3374.
- Oberhelman R, Taylor DN (2000). *Campylobacter* infections in developing countries. In Nachamkin I, Blaser M.J, editors, Washington Am Soc Microbiol: 139-153.
- Okeke I, Ojo O, Lamikanra A, Kaper JB (2003). "Etiology of acute diarrhea in adults southeastern Nigeria." Journal of Clinical Microbiology **41**: 4525-4530.
- OMS (1997). "Weekly Epidemiology Records." **72**: 73-80.
- OMS (2005). "Shigellose: charge de morbidité, épidémiologie et prise en charge des cas." REH **80**: 94-99.
- OMS (2009). La diarrhée. Aide-mémoire n°330.
- OMS (2013). Aide-mémoire 330.
- Palmer C, Bik EM, Eisen MB, Eckburg PB, Sana TR, Wolber PK, et al (2006). "Rapid quantitative profiling of complex microbial populations." Nucleic Acids Research **34** (1): 1-10.
- Pan J, Ye R, Meng DM, Zhang W et al (2006). "Molecular characteristics of class I and class 2 integron and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **58** 288-296.
- Pantosti A, Sanchini A, Monaco M (2007). "Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*." Future Microbiology **2**: 323-334.

Références bibliographiques

- Parashar U, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI (2003). "Global illness and deaths caused by Rotavirus disease in children." Emerging Infectious Diseases **9** (5): 565-572.
- Paterson D, Ko WC, Von Gottberg A, et al (2001). "Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory." Journal of Clinical Microbiology **39**: 2206-2212.
- Piddock L (2002). "Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals1." FEMS Microbiology Reviews **26** (1): 3 -16.
- Ploy MC, Denis F (2000). "Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of hybrid class 2 integron." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44** (10): 2684-2688.
- Ploy MC, Gassama A, Chainier D, Denis F (2005). "Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques." Immuno-Analyse et Biologie Spécialisée **20**: 343-352.
- Ploy MC, Denis F, Courvalin, P., Lambert, T. (2000). "Molecular characterisation of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44**(10): 2684-2688.
- Quilici M, Massenet D, Gake B, Bwalki B, Olson DM (2010). "*Vibrio cholerae* O1 variant with reduced susceptibility to ciprofloxacin, Western Africa." Emerging Infectious Diseases **16** (11): 1804–1805.
- Quincampoix J, Mainardi JL (2001). "Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif." Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation **10**: 267-275.
- Quinn J, Miyashiro D, Sahn D, et al (1989). "Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **33**: 1451-1456.
- Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM (2007). "Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited." Environmental Microbiology **9** (9): 2125-2136.
- Ramirez, M., Vargas L, Cagnoni J, Takumoto V, et al (2005). "Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**: 4418-4420.
- Recchia GD, Hall RM (1995). "Gene cassettes: a new class of mobile element." Microbiology **141**: 3015-3027.
- Recchia GD, Hall RM (1997). "Origine of the mobile gene cassettes found in integrons." Trends Microbiology **5**: 389-394.
- Recchia, GD, Hall RM (1997). "Origine of the mobile gene cassettes found in integrons." Trends Microbiology **5**: 389-394.
- Regagnon C, Chambon M, Archimbaud C, Charbonne F, et al (2005). "Diagnostic rapide des infections à rotavirus: étude prospective comparative de deux techniques de détection d'antigènes dans les selles." Pathologie Biologie **54**: 343-346.
- Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, et al (2007). "Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics." BMC Infectious Diseases **7**: 104.
- Rituparna D, Jayeeta BG, Sourav SG, Yoshifumi T, Balakrish Nair G (2013). "The role of *Vibrio cholerae* genotyping in Africa." Journal of Infectious Diseases **208**: 32-38.
- Rowe-Magnus D, Guerout AM, Mazel D (1999). "Super-intégrons." Research Microbiology **150**: 641-651.
- Roy PH (1997). "Dissémination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries." Synthèse Médecine/Sciences **13**: 927-933.

Références bibliographiques

- Samal S, Khuntia HK, Nanda PK, Satapathy CS, et al (2008). "Incidence of bacterial enteropathogens among hospitalized diarrhea patients from Orissa, India." Japanese Journal of Infectious Diseases **61(5)**: 350-355.
- Sambe-Ba B, Seck A, Wane AA, Fall-Niang NK, Gassama-Sow A (2013). "Sensibilité aux antibiotiques et supports génétiques de la résistance des souches de *Shigella flexneri* isolées à Dakar de 2001 à 2010." Société de Pathologie Exotique **106(2)**: 89-94.
- Sansonetti P (2006). "Shigellosis: an old disease in new clothes?" PLoS Med **3 (9)**: e354.
- Sarfati C, Liguory O, Derouin F (2001). Les microsporidies La Presse médicale Masson, Paris. **30 (3)**: 143-147.
- Sartor R (2008). "Microbial influences in inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **134 (2)**: 577-594.
- Savage D (1977). "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." Annual Review of Microbiology **31**: 107-133.
- Scaletsky I, Fabbriocotti SH, Silva SOC, Morais MB, Fagundes-Neto U (2002). "Hep-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. ." Emerging Infectious Diseases **8 (8)**: 855-858.
- Scheftel J (2010). Entérobactéries, Google.net.
- Scott D, Kaper JB (1994). "Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin." Infectiology and Immunology **62**: 242-251.
- Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Gouriet F, Fournier PE, et al (2013). "Emergence of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of MALDI-TOF mass spectrometry." Journal of Clinical Microbiology **In press**.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al (2009). "Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry." Clinical Infectious Diseases **49 (4)**: 543-551.
- Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La SB, Drancourt M, Raoult D (2010). "MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology." Future Microbiology **5(11)**: 1733-1754.
- Shah A, Hasan F, Ahmed S, et al (2004). "Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection." Critical Review Microbiology **30**: 25-32.
- Shapiro R, Kumar L, Phillips-Howard P, Wells JG, et al (2001). "Antimicrobial-resistant bacterial diarrhea in rural western Kenya." Journal of Infectious Diseases **183 (11)**: 1701-1704.
- Siala E, Chabchoub N, Bouratbine A, Aoun K (2007). "Les microsporidies intestinales: épidémiologie, pathogénie et diagnostic." Revue Tunisienne d'Infectiologie **1 (1)**: 20 - 24.
- Siu L, Lo JYC, Yuen KY, et al (2000). "β-Lactamases in *Shigella flexneri* isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel oxa-1-Like β -Lactamase, oxa-30." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44 (8)**: 2034-2038.
- Silly R, Collis CM, Hall MR (2002). "Class 1 integron containing a new gene cassette, *aadA10*, associated with *Tn1404* from R151." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **46**: 2400-2408.
- Stephen A, Cummings JH (1980). "The microbial contribution to human faecal mass." Journal of Medical Microbiology **13 (1)**: 45-56.
- Stockes H, Hall RM (1989). "A novel family of potentially mobil DNA element engoing site-specific gene-integration function: integrons." Molecular Microbiology **3**: 1669-1683.

Références bibliographiques

- Stockes HW, Hall RM (1989). "A novel family of potentially Mobil DNA element engoing site-specific gene-integration function: integrons." Molecular Microbiology **3**: 1669-1683.
- Stuart C (2006). "Diarrhoeagenic *Escherichia coli* an emerging problem?" Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases **41**: 93-98.
- Suau A, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J (1999). "Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut." Applied Environmental Microbiology **65**: 4799-4807.
- Sundström L, Roy PH, Ola S (1991). "Site-specific insertion of three structural gene cassette in transposon *Tn7*." Journal of Bacteriology: 3025-3028.
- Sundström L, Sköld O (1990). "The *dhfrI* trimethoprim resistance gene of *Tn7* can be found at specific sites in other genetic surroundings." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **34** (4): 642-650.
- Sundström L, Sköld, O. (1990). "The *dhfrI* trimethoprim resistance gene of *Tn7* can be found at specific sites in other genetic surroundings." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **34**(4): 642-650.
- Thapar N, Sanderson IR (2004). "Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries." Lancet **363** (9409): 641-653.
- Tietze E, Brevet J, Tschape H (1987). "Relationships among the streptothricin resistance transposons *Tn 1825* and *Tn 1826* and the trimethoprim resistance transposons *Tn7*." Plasmids **18** (3): 246-249.
- Tindall B, Grimont PAD, Garrity GM, Euze' by JP (2005). "Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**: 521-524.
- Turnbaugh P, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI (2007). "The human microbiome project." Nature **449** (7164): 804-810.
- Turner S, Luck SN, Sakellaris H, Rajakumar K, Adler B (2004). "Role of attP in Integrase-Mediated Integration of the *Shigella* Resistance Locus Pathogenicity Island of *Shigella flexneri*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(3): 1028-1031.
- Van der Poel W, Vinjé J, Van der Heide R, Herrera MI, et al (2000). "Norwalk-like calicivirus genes in farm animals." Emerging Infectious Diseases **6** (1): 36-41.
- Vargas M, Gascon J, Casals C, Schellenberg D, et al (2004). "Etiology of diarrhea in children less than five years of age in Ifakara, Tanzania." American Journal of Tropical Medecine and Hygiene **70** (5): 536-539.
- Vartoukian, S., Palmer RM, Wade WG (2010). "Strategies for culture of 'unculturable' bacteria." FEMS Microbiology Letters **309** (1): 1-7.
- Vourly, S., Tzouveleki LS, Tzelepi E, Lebessi E, et al (2003). "Characterization of *In111*, a class 1 integron that carries the extend-spectrum b-lactamase gene *blaIBC-1*." FEMS Microbiology Letters **225** (1): 1491-1583.
- Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M (2010). "The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition." Diabetologia **53**(4): 606-613.
- Watson G, Witkowski Z (1992). DNA recombinant.
- Weill FX (2010). "Typhoid fever: facing the challenge of resistant strains." Medecine Sciences **26**: 969-975.
- White P, McIver CJ, Rawlinson WD (2001). "Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45** (9): 2658-2661.
- WHO (2013). The global view of campylobacteriosis. R. o. a. E. Consultation.
- Willets N, Wilkins B (1984). "Processing of plasmid DNA during bacterial conjugaison." Microbiology Review **48**: 24-41.

Références bibliographiques

- Winokur P, Canton R, Casellas JM, et al (2001). "Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region." Clinical Infectious Diseases **32**: 94-103.
- Witchitz J (1982). Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens.
- Woese C (1987). "Bacterial evolution." Microbiology Review **51**: 221-271.
- Woese C, Fox GE (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **74 (11)**: 5088-5090.
- Young H, Qumsieh MJ, McIntosh, ML (1994). "Nucleotide sequence and genetic analysis of the type Ib trimethoprim-resistant, *Tn4132* encoded dihydrofolate reductase." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **34 (5)**: 715-725.
- Zoetendal E, Akkermans AD, de Vos WM (1998). "Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria." Applied Environmental Microbiology **64**: 3854-3859.
- Zogheib E, Dupont H (2005) "Entérobactéries multirésistantes." Conférences d'actualisation, 153-165.
- Zoungrana E (2009). Les salmonelloses fasosanté.net.

Annexes

Annexes

Volume des selles par 24 heures : <input type="checkbox"/> ₀	100ml <input type="checkbox"/> ₁ 100 à 500ml <input type="checkbox"/> ₂ >500ml	
Nombre des selles par 24 heures:	<3 <input type="checkbox"/> ₁ ≥3 <input type="checkbox"/> ₂	

FICHE D'ANALYSE DES SELLES

Partenaires : <ul style="list-style-type: none">Unité d'Epidémiologie des Maladies Infectieuses : Alioune Badara LY, Laurence BARIL, Joseph FAYEMinistère de la Recherche	Institut Pasteur de Dakar Unité de Bactériologie Expérimentale Dr Amy Gassama SOW, Chef de projet Bissoume Sambe BA, Investigatrice Abdoul Aziz WANE, Technicien ☎ + 221 33 839 92 35
---	---

IV. IDENTIFICATION DU PATIENT Identification du patient : <input type="checkbox"/> (=Identifiant dans le Questionnaire clinique) Prénom et nom du patient : Sexe : <input type="checkbox"/> ₁ Masculin <input type="checkbox"/> ₂ Féminin Date de naissance du patient : <input type="checkbox"/> /jj/mm/aaaa Ou Age (en années) : <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Zone de validation
V. ANALYSE DES SELLES Date du prélèvement : <input type="checkbox"/> /jj/mm/aaaa	
II.I. Examen macroscopique a) Aspect des selles : Molles : <input type="checkbox"/> ₀ Non <input type="checkbox"/> ₁ Oui Dures sèches : <input type="checkbox"/> ₀ Non <input type="checkbox"/> ₁ Oui Glaireuses : <input type="checkbox"/> ₀ Non <input type="checkbox"/> ₁ Oui Sanguinolentes : <input type="checkbox"/> ₀ Non <input type="checkbox"/> ₁ Oui Liquides : <input type="checkbox"/> ₀ Non <input type="checkbox"/> ₁ Oui A fécales : <input type="checkbox"/> ₀ Non <input type="checkbox"/> ₁ Oui	
b) Présence de corps étrangers :	

Annexes

Parasites adultes : Non Oui

II.2. Examen microscopiques

a) Etat frais :

Œufs d'ascaris : Non Oui

Oxyures : Non Oui

Schistosomes : Non Oui

Giardia intestinalis : Non Oui

Trichomonas intestinalis : Non Oui

Leucocytes : Non Oui

Hématies : Non Oui

Levures : Non Oui

Cellules épithéliales : Non Oui

Filaments mycéliens : Non Oui

b) Réalisation du Gram : Gram : Positif Négatif

c) Test du MIF :

d) Test de Kinyoun : Cryptosporidies : Oui Non

e) Test Trichome de Weber : Microsporidies : Oui Non

Aspect de la flore : Equilibrée Déséquilibrée Autre

f) Recherche de virus entériques par agglutination :

Rotavirus : Non Oui

Adénovirus : Non Oui

Calciavirus : Non Oui

Norovirus : Non Oui

parasitad

œufs ascari

oxyures

schistosome

giardia

trichomon

leucocyt

hématies

levures

cellules

filaments

gram

cryptospor

microspor

aspect flo

aspect flo

rotavirus

adénovirus

Entérovirus : Non Oui

II.3. Coproculture :

a) Tests de BCP, Mueller Kauffman, Hektoen 1, Hektoen 2 :

Salmonella : Non Oui

Shigella : Non Oui

Escherichia coli pathogènes : Non Oui

Aeromonas : Non Oui

Autres : Non Oui

b) Tests de TCBS, EPHSA : Vibrio : Non Oui

c) Test de la Géllose au sang : Campylobacter : Non Oui

Agents non spécifiques :

Klebsiella : Non Oui

Morganella : Non Oui

Citrobacter : Non Oui

d) Bactéries isolées :

Nom de la bactérie isolée.....

Type de la bactérie isolée.....

Antibiogramme :

Ampicilline : Sensible Résistant

Amoxicilline : Sensible Résistant

calceivirus

norovirus

enterovirus

salmonic

shigella

colibactin

aeromonas

autres

vibrio

campyl

klebsiella

morganella

citrobac

ba. st. kol

campylobact

Annexes

Amoxicilline/acide clavulanique :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> ampic
Ticarcilline :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> amox
Ticarcilline/ acide clavulanique :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> amoxclv
Pipéracilline :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> ticarcil
Pipéracilline/tazobactan :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> ticarcilde
Mécillinaam :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> piperidil
Impénème :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> pipermeilzz
Méropénème :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> merop
Ertapénème :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> meropenam
Doripénème :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> doripenam
Aztréonam :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> aztreonam
Céfalotine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefalotin
Céfuroxime :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefuroxim
Céfamandole :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefamandol
Céfoxitine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefoxitim
Céfotétan :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefotetan
Latamoxef :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> latamoxef
Céfotaxime :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefotaxim
Ceftizoxime :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> ceftizoxim
Ceftriaxone :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> ceftriaxon
Ceftazidime :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> ceftazidim
Céfépime :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefepim
Cefpirome :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefpirom
Céfixime :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> cefixim
Kanamycine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> kanamycin
Tobramycine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> tobramycin
Amikacine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> amikacin
Isepamicine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> isepamicin
Gentamicine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> gentamicin
Nétilmicine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> netilmicin
Chloramphénicol :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> chloramphenicol
Trétracycline :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	
Minocycline :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	
Tigécycline :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	

Annexes

Colistine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> tetracy
Sulfamides :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> minocyclin
		<input type="checkbox"/> tigecycline
		<input type="checkbox"/> colistine
		<input type="checkbox"/> sulfamide
Triméthoprimé :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> trimétho
Triméthoprimé/Sulphaméthoxazole :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> triméthoSul
Nitrofuranes :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> nitrofuran
Acides oxolinique :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> acidoxolin
Fluméquine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> flumequin
Acide nalidixique :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> acéquanilic
Acide pipéridique :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> acéquin
Acide piromidique :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> érimothox
Ciprofloxacine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> ciprofloxi
Enoxacine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> enoxacin
Lévofloxacine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> levoflox
Moxifloxacine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> moxiflox
Norfloxacine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> norfloxa
Ofloxacine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> ofloxacin
Péploxacine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> péfloxa
Fosfomycine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> fosfomycin
Azithromycine :	<input type="checkbox"/> ₁ Sensible <input type="checkbox"/> ₀ Résistant	<input type="checkbox"/> azithrom

Annexes

ANNEXE 2

Composition de milieux de culture

Gélose Trypto-caséine-soja (TCS)

C'est un milieu de culture très nutritif qui permet une croissance des germes aérobies ou anaérobies sans l'adjonction de substances nutritives.

- Hydrolysate trypsine de caséine (17g/l)
- Peptone de soja (3g/l)
- Chlorure de sodium (5g/l)
- Phosphate de potassium (2,5g/l)
- Glucose (2,5g/l)

Verser 40g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dilution complète. Stériliser à l'autoclave.

Gélose Mueller-Hinton (MH)

C'est un milieu utilisé pour la recherche de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

Mueller Hinton 64884 Biorad (boite ronde 90 mm ; boite carrée 120 mm)

Macération de viande de bœuf	300 ml
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	10 g

Verser 35g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave.

Gélose BCP (Bromo-Crésol-Pourpre) (64444 Biorad) (boite ronde 90mm)

Peptone	5g
Extrait de viande	3g
Lactose	10g
Agar	15g
Pourpre de bromocrésol	0,025g
Eau qsp	1L

Gélose Hektoen 64284 Biorad (boite ronde 90mm)

Protéose peptone	12g
Extrait de levure	3g

Annexes

Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5 g
Sels biliaires	9 g
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5 g
Salicine	2 g
Lactose	12 g
Saccharose	12 g
Fuschine acide	0,1 g
Bleu de bromothymol	0,065 g
Agar	14 g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

Gélose TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose) gélose, ph 8,6 environ

Milieu pour isolement de *Vibrio cholera*, *Vibrio parahemolyticus* et *Vibrio alginolyticus*

Verser 88g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Ne pas autoclaver.

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Citrate de sodium	10g
Thiosulfate de sodium	10g
Chlorure de sodium	10g
Bile de bœuf	8g
Citrate ferrique	1g
Saccharose	20g
Bleu de bromothymol	0,04g
Bleu de thymol	0,04g
Agar	14g

Gélose Columbia 64674 Biorad + 5% de sang de mouton (boite ronde 90mm)

Mueller Hinton + 5% de sang de mouton

Gélose Rambach 1.07500.0002 Merck (boite ronde 90mm)

Peptone	8,0
---------	-----

Annexes

Chlorure de sodium	5,0
Désoxycholate de sodium	1,0
Mélange Chromogène	1,5
Propylène	10,5
Agar-agar	15,5

Gélose Karmali Oxoid CM 0935 (boite ronde 90 mm)

Gélose de base Columbia	39,0
Charbon activité	4,0
Hémine	0,032
Supplément sélectif SR0205	4 ml

pH 7,4 ±0,2

Bouillon Mueller-Kauffman 1.10863 Merck

Peptone de soja	2,3g
Hydrolysate tryptique de caséine	7
Chlorure de sodium	2,3
Carbonate de calcium	25
Thiosulfate de sodium	40,7
Bile de bœuf	4,75

Bouillon Preston Oxoid CM0067+ 5% de sang de cheval

Extrait de viande de bœuf	10,0
Peptone	10,0
Chlorure de sodium	5,0

pH 7,5 ± 0,2

Milieu urée tryptophane ou urée indole (biomérieux)

L-tryptophane	3 g
Urée	20 g
Hydrogénophosphate de potassium	1 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1 g
NaCl	5 g
Alcool à 95°	10 mL

Annexes

Rouge de phénol	25 mg
Eau distillée	1L
Kligler Hajna 64844 Biorad (tube avec culot et pente)	
Extrait de viande de bœuf	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone (riche en lysine)	20 g
NaCl	5 g
Citrate ferrique	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Lactose	10 g
Glucose	1 g
Rouge de phénol (solution à 1%)	5 ml
Agar	12g
Eau distillée (qsp)	1L

Les caractères biochimiques de la galerie API20E : (β - galactosidase (ONPG), arginine dihydrolase (ADH), lysine décarboxylase (LDC), ornithine décarboxylase (ODC), citrate de Simmons (Cit), formation de H₂S, uréase, tryptophane désaminase (TDA), indole, acétone (VP), protéolyse de la gélatine, cytochrome oxydase, formation de nitrites (Nit), formation de gaz, catalase et la fermentation des glucides (D-glucose (GLU), D-mannitol (MAN), inositol (INO), D-sorbitol (SOR), L-rhamnose (RHA), D-saccharose (SAC), D-melibiose (MEL), amygdaline (AMY), L-arabinose (ARA) L(+)

Amorces utilisés pour la recherche d'intégrons et de gènes de résistance

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Température d'hybridation (°C)	Taille
36839	ACA TGT GAT GGC GAC GCA CGA	58	580
37246	ATT TCT GTC CTG GCT GGC GA	58	580
<i>Sul1</i>	GTC CGA CAT CCA CGA CGT CTG ATC	62	433
<i>Sul2</i>	CCT GGA GAT CTG CGA AGC GCA ATC	62	293

Annexes

<i>Int2</i>	F: CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T R: GTA GCA AAC GAC TGA CGA AAT G	62	806
<i>aadA2</i>	GAA TGA TGT CGT CGT GCA CAA C		
<i>Int3R</i>	F: gCC CCg gCA gCg ACT TTC Ag R: ACg gCT CTg CCA AAC CTg ACT	62	1200
<i>tetA</i>	F: gTA ATT CTg AgC ACT gTC gC R: CTg CCT ggA CAA CAT TgC TT	55	400
<i>tetB</i>	F: CTC AgT ATT CCA AgC CTT Tg R: ACT CCC CTg AgC TTg Agg gg	55	400
<i>tetC</i>	F: ggT TgA Agg CTC TCA Agg gC R: CCT CTT gCg ggA ATC gTC C	58	—
<i>tetG</i>	F: gCA gCg AAA gCg TAT TTG Cg R: TCC GAA AgC TgT CCA AgC AT	58	—
<i>gyrA</i>	F: TACACCGGTCAACATTGAGG R: TTAATGATTGCCGCCGTCGG	60	647
<i>gyrB</i>	F: TGAAATGACCCGCCGTAAAGG R: GCTGTGATAACGCAGTTTGTCCGGG	60	309
<i>parC</i>	F: GTCTGAACTGGGCCTGAATGC R: AGCAGCTCGGAATATTTGACAA	60	248
<i>parE</i>	F: ATGCGTGCGGCTAAAAAAGTG R: TCGTCGCTGTCAGGATCGATAC	60	289
<i>qnrA</i>	F: TCAGCAAGAGGATTTCTC R: GGCAGCACTATTACTCCCA	53	657
<i>qnrB</i>	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	53	469
<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA R: TAAATTGGCACCCTGTAGGC	53	417
<i>qepA</i>	R: CCGACAGGCCACGACGAGGATGC F: CGGCGGCCGTGTTGCTGGAGTTCTT	58	189
<i>aac(6)-Ib</i>	F: 5'TAA GGATGTGCTTATGATGGACAC3' R: 5'CGTGATGAATAAAGATACTCATAG3'	58	519

Annexes

Amorces des gènes de virulence

Tableau: Amorces utilisés et leurs caractères

Pathotypes	Gènes	Séquences (5'-3')	Température d'hybridation	Taille (bp)
ETEC	<i>STa</i>	F: TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG R: CTTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC	43	180
	<i>LT</i>	F: GGCGACAGATTATACCGTGC R: CCGAATTCTGTTATATATGTC	56	707
EPEC	<i>eae</i>	F: CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA R: CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA	65	494
	<i>bfpA</i>	F: AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC R: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	57	324
EHEC	<i>SLTI</i>	F: TTTACGATAGACTTCTCGAC R: CACATATAAATTATTTGCTC	56	130
	<i>SLTII</i>	F: CTTCACGTCACCATACATAT R: ACGATGTGGTTTATTCTGGA	56	346
EIEC	<i>ipah</i>	F: CTGGATGGTATGGTGAGG R: GGAGGCCAACAATTATTTCC	53	424
EAEC	<i>afa</i>	F: CTGGCGAAAGACTGTATCAT R: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	65	750
EAggEC	<i>eagg</i>	F: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT R: CTGGCGAAAGACTGTATCAT	53	630

- La densité optique (DO) est utilisée pour calculer la concentration des amorces.

La formule est la suivante :

Si l'amorce est en lyophilisé, rajouter dans le tube 100µl H₂O.

Le volume à prélever est $V_1 = 1000/20 \times DO$. 10 µl sont prélevés et représentent le volume V₂.

A ce volume, compléter par un volume V pour obtenir 100µl.

A partir de ce volume, la concentration finale est égale au nombre de moles sur volume.

Annexes

ANNEXE 3

Antisérums et disques d'antibiotiques

Antisérums *Shigella*

Shigella sonnei : antisérum mixte Bio-Rad Marnes-la-coquette

Shigella flexneri : antisérum polyvalent, Bio-Rad Marnes-la-coquette, antisérums monovalents (laboratoire EURO BIO)

Shigella dysenteriae : antisérums A1, A2 et monovalent pour dysenteriae 1 (Bio-Rad Marnes-la-coquette).

Shigella boydii : antisérums polyvalents C1, C2, C3 (Bio-Rad Marnes-la-coquette)

Antibiotiques (Biorad)

Amoxicilline (10 μ g), Amoxicilline + acide clavulamique (20/10 μ g), ticarcilline (75 μ g), Céfalotine (30 μ g), Céfoxitine (30 μ g), Céfotaxime (30 μ g), Ceftazidime (30 μ g), Gentamicine (15 μ g), Tobramycine (10 μ g), Amikacine (30 μ g), Tétracycline (30 μ g), Chloramphénicol (30 μ g), Acide nalidixique (30 μ g), Norfloxacin (10 μ g), Péfloxacin (5 μ g), Ciprofloxacine (5 μ g), TriméthoprimeSufaméthoxazole (1,25 μ g/23,75 μ g), Sulfamides (300 μ g), Spectinomycine (100 μ g), Streptomycine (10 μ g), Furanes (20 μ g).

Réalisation de l'antibiogramme

Pour la réalisation des antibiogrammes:

-Tubes à hémolyse

Boîtes carrées à Muller Hinton (MH)

Ecouvillons

Disques d'antibiotiques à tester

Distributeur automatique à disque

Etuve à 37°C

Préparation des lysats

Tubes à hémolyse

Eppendorf 2ml

Appareil de chauffage 100-150°C

Centrifugeur 6000-12000rpm

Amplifications géniques (PCR)

Cônes : jaune, bleu, blanc

Annexes

Pipettes : 1-10ul

Pipettes : 10-50ul

Pipettes : 50-100ul

Pipettes : 100-1000ul

Tubes eppendorf 2 ml

Tubes PCR 150ul

Thermocycleur

Balance

Hotte

Four micro-onde

Cuve de migration

Générateur

Gants

Appareil polaroid pour photographier les gels

Casque protecteur

Nucléotides

-dATP250ul

-dCTP.....250ul

-dGTP.....250ul

-dTTP.....250ul

Eau distillée19ml

Aliquoter et conserver à -20°c

Tampon de migration TBE (10X)

-Tris base.....108g

-EDTA.....9,3g

-Acide borique.....55g

Eau distillée.....1000ml

Conserver à la température du laboratoire.

Tampon de migration TAE 50X

-Tris base.....242g

-Acide acétique glacial.....57,1ml

-EDTA 0,5M, pH 8.....100ml

Annexes

-Eau distillée qsp.....1000ml

Dissoudre, ajuster à pH 8

Autoclaver 20mn à 110°C et conserver à la température du laboratoire

Solution de bleu pour dépôt d'amplicons

- Glycérol.....5ml

- Tampon TEK.....5ml

- Bleu de bromophénol.....7mg

Dissoudre, aliquoter et conserver à +4°C

L'EDTA 0,5M

-Triplex III.....186g

Eau distillée qsp.....1000ml

Dissoudre avec un barreau aimanté sur un agitateur magnétique, ajuster à pH 8.

Conserver à la température du laboratoire

Ladder (marqueur de taille des fragments d'ADN)

-DNA ladder (échelle 1Kb).....50ul

-Solution bleu pour dépôt.....250ul

Eau distillée.....350ul

Mélanger et conserver à +4°C.

Les différentes amplifications géniques

PCR 36839/37246

- Composition du mélange réactionnel

Réactifs	Volume pour une réaction (en µl)
Tampon 10X	5
Dntp	5
MgCl ₂	2
36839	1,5
37246	1,5

Annexes

Taq	0,2
H2O	29,8

On prend 5ul de lysat pour avoir dans chaque tube un volume final de 50ul.

Le témoin positif utilisé est Escherichia coli (ref. 11144).

- Programme

94°C	3mn	dénaturation	
94°C	30s	dénaturation	
58°C	1mn	hybridation	35 cycles
72°C	1mn	élongation	
72°C	10mn	élongation	
4°C	infini		

L'électrophorèse se fait sur gel d'agarose 1% dans TBE 1X

La taille recherchée est : 580pb.

- Le programme PCR Sul1/Orf4, Orf6/Sul3, 36854/36855, 36854/36856 est le même que celui de 36839/37246.

- PCR Int2F/Int2R

Composition du mélange réactionnel

Réactifs	Volume pour une réaction (en µl)
Tampon10X	5
Dntps	8
Int2F	1,5
Int2R	1,5
H2O	28,5
Taq	0,5

Annexes

On prend 5ul de lysat pour un volume final de 50ul.

Le témoin positif est Escherichia coli (ref. 95b).

Le programme utilisé est le suivant :

94°C	5mn	dénaturation	
94°C	30s	dénaturation	
62°C	1mn	hybridation	30 cycles
72°C	1mn	élongation	
72°C	10mn	élongation	
4°C	infini		

L'électrophorèse se fait sur gel d'agarose 1% dans TBE 1X

La taille recherchée est de : 806pb

- PCR Int3F/Int3R

Le mélange réactionnel est le même que celui de Int1F/Int1R

Le programme est le suivant :

94°C	5mn		
94°C	30s		
62°C	1mn	25 cycles	
72°C	1mn		
72°C	10mn		
4°C	infini		

- Programme PCR IntCS2/Int7S, Int2S/aadA2, Int2S/Sat2, Orfx3/Sat1 est le même que celui de Int2F/Int2R.

Annexes

De même que les programmes PCR

Hep74/ Sat2 avec taille attendue : 1kb

Hep74/ aadA2 : 1,2kb

Témoin positif Shigella sonnei (n°12 et 14)

- PCR séquençage

Composition du mélange réactionnel

Réactifs	Volume pour une réaction (en μ l)
DNA purifié	3
Amorce	1,25
H2O	3,25
Big dye	4

Volume final dans un tube est 11 μ l.

Pour purifier ce produit avant séquençage, compléter à 20 μ l avec H2O

Programme:

96°C	10s	
50°C	5s	25cycles
60°C	4mn	
4°C	infini	

Annexes

ANNEXE 4

Tableau: Répartition des 189 espèces bactériennes (détectées par MALDI-TOF) entre 162 patients souffrant de diarrhée et 185 personnes sans diarrhée obtenue à partir de 2.750 isolats.

Phylum	Bactéries	162 avec diarrhée		185 sans diarrhée		Total	%	P
		N° d'isolat	%	N° d'isolat	%			
<i>Proteobacteria</i>	<i>Escherichia coli</i>	104	64.2	137	84.9	261	75.2	≤10 ⁻³
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	102	63	154	83.2	256	73.8	≤10 ⁻³
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium bifementans</i>	60	37	99	53.5	159	45.8	0.002
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	76	46.9	77	41.6	153	44	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	53	32.7	99	53.5	152	43.8	≤10 ⁻³
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	57	35.2	80	43.2	137	39.5	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	48	29.7	58	31.3	106	30.5	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	34	21	52	28.1	86	24.8	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	20.4	51	27.6	84	24.2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium sordellii</i>	29	17.9	48	25.9	77	22.2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	23	14.2	34	18.4	57	16.4	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	20	12.5	35	18.9	55	15.8	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus avium</i>	20	12.3	32	17.3	52	14.5	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium orbiscindens</i>	12	7.4	30	16.2	42	12.1	0.01
<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	23	14.2	18	9.7	41	11.8	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides uniformis</i>	8	5	30	16.2	38	10.9	0.001
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ¹	22	13.6	15	8.1	37	10.7	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium symbiosum</i>	10	6.2	25	13.5	35	10	0.03
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	10	6.2	25	13.5	35	10	0.03
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	9	5.5	21	11.3	30	8.6	
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus equinus</i>	13	8	16	8.6	29	8.4	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>	6	3.7	20	10.8	26	7.5	0.01
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i> ¹	19	11.7	7	3.8	26	7.5	0.002
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	16	9.9	10	5.4	26	7.5	
<i>Firmicutes</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> ¹	4	2.5	21	11.3	25	7.2	0.001
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	10	6	14	7.6	24	6.9	
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	16	9.9	8	4.3	24	6.9	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	9	5.6	15	8.1	24	6.9	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Eggerthella lenta</i>	4	2.5	19	10.3	23	6.6	0.004
<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas kerstersii</i>	8	4.9	12	6.5	20	5.8	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	6	3.7	13	7	19	5.5	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium glycolycum</i>	5	3	14	7.6	19	5.5	

Annexes

<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2	1.2	16	8.7	18	5.2	$\leq 10^{-3}$
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ¹	10	6.2	8	4.3	18	5.2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium tertium</i>	11	6.8	7	3.8	18	5.2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium cochlearium</i>	4	2.5	12	6.5	16	4.6	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>	7	4.3	8	4.3	15	4.3	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Morganella morganii</i>	6	3.7	9	4.9	15	4.3	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> ¹	10	6.2	3	1.6	13	3.7	0.02
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium lituseburense</i> ¹	4	2.5	9	4.9	13	3.7	
<i>Firmicutes</i>	<i>Kurthia gibsonii</i> ¹	2	1.2	11	5.9	13	3.7	0.02
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium ramosum</i>	5	3	7	3.8	12	3.5	
<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	6.2	2	1	12	3.5	0.01
<i>Firmicutes</i>	<i>Weissella cibaria</i> ¹	4	2.5	8	4.3	12	3.5	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> ¹	4	2.5	7	3.8	11	4	
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	8	4.9	3	1.6	11	3.2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus circulans</i>	5	3	5	2.7	10	2.9	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	5	3	4	2.2	9	2.6	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus thailandicus</i> ²	3	1.8	6	3.2	9	2.6	
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	3	4	2.2	9	2.6	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus canintestini</i>	4	2.5	4	2.2	8	2.3	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus durans</i>	6	3.7	2	1	8	2.3	
<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	4.3	1	0.5	8	2.3	0.02
<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	5	3	2	1	7	2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus siralis</i>	3	1.8	4	2.2	7	2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus dispar</i>	4	2.5	3	1.6	7	2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i> ³	3	1.8	4	2.2	7	2	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	5	3	2	1	7	2	
<i>Firmicutes</i>	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	2	1.2	4	2.2	6	1.7	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	4	2.5	2	1	6	1.7	
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	2.5	2	1	6	1.7	
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ³	5	3	1	0.5	6	1.7	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	1	0.6	5	2.7	6	1.7	
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium limosum</i>		0	5	2.7	5	1.4	0.04
<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus pueri</i>	2	1.2	3	1.6	5	1.4	
<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	3		0	5	1.4	0.02
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	4	2.5	1	0.5	5	1.4	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2	1.2	3	1.6	5	1.4	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	3	1.8	2	1	5	1.4	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1.2	3	1.6	5	1.4	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	4	2.5		0	4	1.1	0.047
<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	4	2.5		0	4	1.1	0.047

Annexes

Firmicutes	<i>Bacillus mojavensis</i>	4	2.5	0	4	1.1	0.047
Firmicutes	<i>C. clostridioforme</i> l	3	1.8	1	0.5	4	1.1
Firmicutes	<i>Clostridium hathewayi</i>	3	1.8	1	0.5	4	1.1
Firmicutes	<i>Clostridium paraputrificum</i>	3	1.8	1	0.5	4	1.1
Firmicutes	<i>Enterococcus asini</i>		0	4	2.2	4	1.1
Firmicutes	<i>Fraxibella magna</i>	4	2.5	0	4	1.1	0.047
Firmicutes	<i>Lactococcus lactis</i> ¹	1	0.6	3	1.6	4	1.1
Firmicutes	<i>Streptococcus mutans</i>	4	2.5	0	4	1.1	0.047
Proteobacteria	<i>Enterobacter asburiae</i>		0	4	2.2	4	1.1
Proteobacteria	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3	1.8	1	0.5	4	1.1
Proteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1.2	2	1	4	1.1
Proteobacteria	<i>Salmonella enterica</i>	3	1.8	1	0.5	4	1.1
Firmicutes	<i>Lactobacillus gasseri</i>	3	1.8		0	3	0.9
Firmicutes	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	0.6	2	1	3	0.9
Firmicutes	<i>Paenibacillus jamilae</i> ²	3	1.8		0	3	0.9
Firmicutes	<i>Paenibacillus larvae</i> ³	3	1.8		0	3	0.9
Firmicutes	<i>Staphylococcus capitis</i>	2	1.2	1	0.5	3	0.9
Firmicutes	<i>Staphylococcus hominis</i>	2	1.2	1	0.5	3	0.9
Firmicutes	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3	1.8		0	3	0.9
Firmicutes	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2	1.2	1	0.5	3	0.9
Firmicutes	<i>Streptococcus alactolyticus</i> ³		0	3	1.6	3	0.9
Proteobacteria	<i>Enterobacter kobei</i>		0	3	1.6	3	0.9
Proteobacteria	<i>Acinetobacter schindleri</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium catemulatum</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium longum</i>		0	2	1	2	0.6
Bacteroidetes	<i>Parabacteroides goldsteini</i> ¹		0	2	1	2	0.6
Bacteroidetes	<i>Parabacteroides johnsonii</i>		0	2	1	2	0.6
Firmicutes	<i>Aneurinibacillus migulanus</i> ¹	2	1.2		0	2	0.6
Firmicutes	<i>Bacillus badius</i>		0	2	1	2	0.6
Firmicutes	<i>Bacillus endophyticus</i> ¹	2	1.2		0	2	0.6
Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i>	2	1.2		0	2	0.6
Firmicutes	<i>Bacillus pseudomycooides</i> ²	1	0.6	1	0.5	2	0.6
Firmicutes	<i>Clostridium aldenense</i>		0	2	1	2	0.6
Firmicutes	<i>Clostridium difficile</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
Firmicutes	<i>Clostridium indolis</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
Firmicutes	<i>Clostridium innocuum</i>	2	1.2		0	2	0.6
Firmicutes	<i>Clostridium subterminale</i> ³	2	1.2		0	2	0.6
Firmicutes	<i>Clostridium tetani</i> ³	1	0.6	1	0.5	2	0.6
Firmicutes	<i>Enterococcus canis</i> ²		0	2	1	2	0.6
Firmicutes	<i>Enterococcus cecorum</i>	2	1.2		0	2	0.6
Firmicutes	<i>Enterococcus pseudoavium</i> ³		0	2	1	2	0.6
Firmicutes	<i>Enterococcus tenue</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6

Annexes

<i>Firmicutes</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> ¹	1	0.6	1	0.5	2	0.6
<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus alvei</i>		0	2	1	2	0.6
<i>Firmicutes</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus gnavus</i> ¹	2	1.2		0	2	0.6
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus infantarius</i>		0	2	1	2	0.6
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	2	1.2		0	2	0.6
<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>		0	2	1	2	0.6
<i>Proteobacteria</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
<i>Proteobacteria</i>	<i>Citrobacter sedlakii</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
<i>Proteobacteria</i>	<i>Klebsiella variicola</i>	1	0.6	1	0.5	2	0.6
<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	2	1.2		0	2	0.6
1 isolate							
<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium afermentans</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Alistipes indistinctus</i>		0	1	0.5	1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Alistipes onderdonkii</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides caccae</i>		0	1	0.5	1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>		0	1	0.5	1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides finegoldii</i>		0	1	0.5	1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides intestinalis</i>		0	1	0.5	1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides nordii</i> ¹		0	1	0.5	1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Peptoniphilus hareii</i>		0	1	0.5	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Abiotrophia defectiva</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus casamancensis</i> ^{1, 4}	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus clausii</i> ¹	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus flexus</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus koreensis</i> ²	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus marisflavi</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus simplex</i>	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> ¹		0	1	0.5	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus coccoides</i>		0	1	0.5	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus agri</i>		0	1	0.5	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus formosus</i> ²	1	0.6		0	1	0.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium baratii</i>	1	0.6		0	1	0.3

Annexes

Firmicutes	<i>Clostridium cadaveris</i> ¹	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Clostridium dakarensis</i> ^{1, 4}	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Clostridium irregulare</i> ³	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Clostridium neonatale</i> ¹	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Clostridium schirmacherense</i> ²	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Clostridium senegalensis</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Enterococcus hermanniensis</i> ²		0	1	0.5	1	0.3
Firmicutes	<i>Enterococcus mundtii</i>		0	1	0.5	1	0.3
Firmicutes	<i>Gemella haemolysans</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Granulicatella adiacens</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Granulicatella elegans</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Lactobacillus salivarius</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>		0	1	0.5	1	0.3
Firmicutes	<i>Paenibacillus motobuensis</i> ²	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Paenibacillus polymyxa</i> ^{1, 3}		0	1	0.5	1	0.3
Firmicutes	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		0	1	0.5	1	0.3
Firmicutes	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Staphylococcus sciuri</i> ¹		0	1	0.5	1	0.3
Firmicutes	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Streptococcus constellatus</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Turicibacter sanguinis</i>	1	0.6		0	1	0.3
Firmicutes	<i>Veillonella parvula</i>	1	0.6		0	1	0.3
Fusobacteria	<i>Fusobacterium varium</i>		0	1	0.5	1	0.3
Proteobacteria	<i>Acinetobacter towneri</i> ²		0	1	0.5	1	0.3
Proteobacteria	<i>Citrobacter braakii</i>	1	0.6		0	1	0.3
Proteobacteria	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0.6		0	1	0.3
Proteobacteria	<i>Enterobacter ludwigii</i> ³		0	1	0.5	1	0.3
Proteobacteria	<i>Kluyvera georgiana</i> ³		0	1	0.5	1	0.3
Proteobacteria	<i>Neisseria flavescens</i>	1	0.6		0	1	0.3
Proteobacteria	<i>Proteus penneri</i>	1	0.6		0	1	0.3
Proteobacteria	<i>Pseudomonas luteola</i>	1	0.6		0	1	0.3
Proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>		0	1	0.5	1	0.3
Proteobacteria	<i>Shigella boydii</i> ¹	1	0.6		0	1	0.3
Proteobacteria	<i>Shigella sonnei</i> ¹	1	0.6		0	1	0.3

¹: Espèces bactériennes identifiées par l'analyse moléculaire de l'ARN 16S

²: Espèces bactériennes jamais isolées chez l'homme

³: Espèces bactériennes isolées chez l'homme mais jamais dans l'intestin

⁴: Nouvelles espèces bactériennes

Espèces significativement plus détectées chez les personnes souffrant de diarrhée
Espèces significativement plus détectées chez les personnes sans diarrhée

Nom et Prénom: Ba Sambe Bissoume

Thèse de Doctorat

Spécialité: Biologie et Pathologies Humaines

Titre: Etude du microbiote digestif sénégalais: détection et caractérisation des pathogènes entériques

Jury: Président: Cheikh Saad-Bouh BOYE Professeur (FMPOS)

Rapporteurs: Coumba TOURE KANE Professeur (ESP)

Mbacké SEMBENE Professeur (FST)

Examineurs: Mady NDIAYE Professeur (FST)

André SPIEGEL Professeur (IPD)

Directeur de thèse: Amy GASSAMA SOW MCA, chargée de recherche (ESP, IPD)

Résumé

Les maladies diarrhéiques constituent un problème de Santé Publique dans les pays en voie de développement. Elles entraînent chaque année 3 millions de décès, en particulier chez les enfants de moins de cinq. L'antibiothérapie est indiquée dans les cas de diarrhées bactériennes et accompagnée d'une réhydratation orale. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer les étiologies des diarrhées infectieuses à Dakar et d'étudier par le MALDI-TOF la composition du microbiote digestif. Par la spectrométrie de masse MALDI-TOF, plus de 15.733 spectres ont été analysés. Au total, 2.753 isolats ont été testés et nous ont permis d'identifier 189 espèces bactériennes dont une espèce inconnue. Les résultats ont montré, qu'au moins un agent pathogène entérique a été isolé chez plus de 60% des patients souffrant de diarrhée. Les agents pathogènes entériques les plus couramment isolés ont été les bactéries 50,5% (152/301) suivis des parasites 45,5% (137/301) et des virus 25,5% (77/301). Des gènes de résistance aux antibiotiques et des intégrons de classe 1 et 2 ont été retrouvés. Des gènes de résistance aux quinolones ont été retrouvés chez une souche de *Shigella flexneri*, des souches de *Salmonella* et de *Escherichia coli*.

Cette étude a démontré d'une part, que dans un milieu urbain au Sénégal, les maladies diarrhéiques sont principalement associées à des bactéries entériques. D'autre part, chez les enfants de moins de cinq ans, les infections virales, en particulier les Rotavirus, étaient prédominantes. Les infections parasitaires survenaient plus fréquemment chez les patients de plus de cinq ans. La résistance aux quinolones est une réalité au Sénégal avec l'émergence de souches de *Shigella flexneri* et de *Salmonella* résistantes. On note également la circulation de souches productrices de bêtalactamases à spectre élargi et de souches porteuses d'intégron.

Par le MALDI-TOF, globalement, le nombre d'espèces de bactéries dans les selles était significativement plus fréquent chez les patients sans diarrhée que ceux avec.

Mots clés: microbiote digestif, pathogène entérique, Sénégal

Title: Senegalese human gut microbiome: detection and characterization of enteric pathogens

Summary

Diarrhoeal diseases are a real public health problem in developing countries. They train. According to the World Health Organization, every year globally, diarrheal disease is cause of 3 million deaths, especially among children under five years old. Antibiotic therapy is required in cases of bacterial diarrhea within oral rehydration. The objectives of this study were to determine etiology of infectious diarrhea in Dakar and by MALDI -TOF mass spectrometry, study the composition of the gastrointestinal microbiota. Results showed that by MALDI -TOF mass spectrometry over 15,733 spectra were analyzed. A total of 2,753 isolates were tested and allowed us to identify 189 bacterial species including one unknown specie. At least one enteric pathogen was isolated from more than 60 % of patients with diarrhea . Enteric pathogens most commonly isolated were bacteria: 50.5% (152 /301) followed by parasites 45.5% (137/301) and viruses 25.5% (77/301). Antibiotic genes resistance and class 1 and 2 integrons were found. Quinolone resistance genes were found in one *Shigella flexneri* strain and in *Salmonella* and *Escherichia coli*. This study showed that , in urban areas of Senegal, diarrheal diseases are mainly associated with enteric bacteria. Overthere, in children less than five years old, viral infections, particularly Rotavirus predominated. Parasitic infections occurred more frequently in patients over five years old. This is the first study in Senegal describing resistance to quinolone on *Salmonella* and *Shigella flexneri* clinical isolates. The increasing quinolone resistance among *Salmonella* and *Shigella* isolates is of actual concern. We also note the circulation of strains extended beta-lactamases spectrum producing and strains carrying integron. By MALDI -TOF, overall, the number of species of bacteria in the feces was significantly more frequent in patients with diarrhea than those without.

Keywords: gut microbiome, enteric pathogene, Dakar-Senegal