

MATERIELS ET METHODES

L'objectif de cette thèse est d'explorer l'hypothèse suivante : les stress subis par campylobacter dans les abattoirs de volailles ont-ils un effet sur la résistance de cette bactérie aux antibiotiques ? Les stress que nous avons retenus sont les procédés d'abattage dans leur ensemble et les procédures de nettoyage et de désinfection. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons réalisé une enquête épidémiologique dans 4 abattoirs de volailles. Ce chapitre présente dans une première partie les objectifs et la réalisation de l'enquête épidémiologique et dans une seconde partie, les techniques de laboratoire utilisées.

Etude épidémiologique

1.1 Protocole de l'étude épidémiologique

1.1.1 Objectifs de l'étude

Nous avons retenu d'étudier, d'une part l'influence des procédés d'abattage et d'autre part, l'influence des procédures de nettoyage et de désinfection sur la résistance aux antibiotiques des campylobacters.

Pour étudier l'influence des procédés d'abattage, nous avons choisi de comparer les campylobacters isolés à partir des prélèvements de fientes à l'arrivée des animaux à l'abattoir à ceux isolés à partir des prélèvements de peaux de cou des animaux avant l'entrée des carcasses en ressuage.

L'influence des procédures de nettoyage et de désinfection a été étudiée sur 2 sites :

- Au niveau des caisses de transport des volailles
- Au niveau des surfaces en contact avec les carcasses pendant l'abattage

Pour ces deux sites, les prélèvements sont réalisés avant et après les procédures de nettoyage et de désinfection.

La première partie de l'étude s'attache à déterminer si les campylobacters survivent sur les surfaces dans les abattoirs de volailles après nettoyage et désinfection. La seconde partie vise à étudier le phénotype et le génotype des souches ayant survécu aux opérations de nettoyage et désinfection afin de déterminer si les opérations de nettoyage et désinfection ont un effet sur la résistance de campylobacter aux antibiotiques.

1.1.2 Définitions des populations étudiées

L'influence des procédés d'abattage peut être étudiée au niveau de la population des campylobacters présents sur les volailles pendant l'abattage (analyse des isolats) ou au niveau de la population hôte « volaille » (analyse au niveau des prélèvements).

L'influence des procédures de nettoyage et de désinfection peut-être étudiée également au niveau de la population des campylobacters (analyse des isolats) ou au niveau des surfaces prélevées (analyse des prélèvements).

Figure 16. Carte de la localisation des élevages de volailles de chair en 2004 et des abattoirs visités (source Agreste 2004)

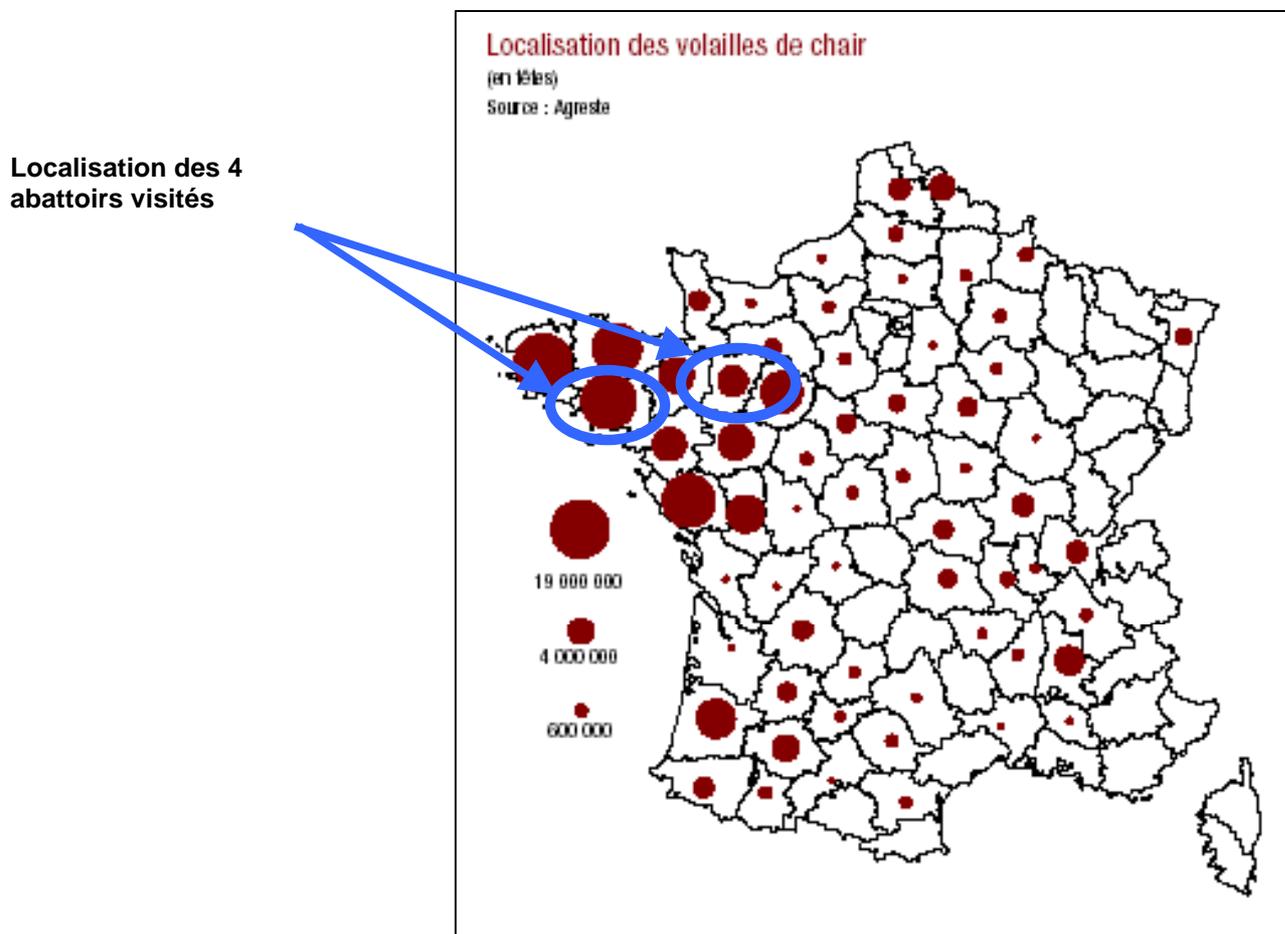


Tableau 18. Dates et saisons des prélèvements dans les 4 abattoirs visités

	2005					2006					
	Eté		Automne			Hiver		Printemps			Eté
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J
Abattoir 1	x						x	x			
Abattoir 2		x									
Abattoir 3					x		x			x	x
Abattoir 4						x					

x: visite réalisée dans l'abattoir

1.1.3 Définition de l'échantillon étudié

Le nombre de prélèvements et de souches nécessaires pour l'ensemble de l'étude varient en fonction de l'écart de résistance que l'on souhaite mettre en évidence ainsi que du niveau initial de résistance observé. En fixant la puissance de l'étude à 80%, pour mettre en évidence une augmentation de l'ordre de 25% des niveaux de résistance observés, il faut travailler sur des tailles d'échantillons d'environ 50. Nous avons choisi de visiter 4 abattoirs différents, afin que les productions ne soient pas liées et de prélever pour l'ensemble, 50 lots de volailles avant et après abattage et de réaliser 50 prélèvements dans les caisses de transport et sur les surfaces de l'abattoir avant et après nettoyage et désinfection.

1.1.4 Justification du choix des abattoirs

Les abattoirs de volailles étant très standardisés en France, il y a peu de différences de fonctionnement (procédés d'abattage ou procédures de nettoyage et désinfection) entre les abattoirs choisis. Le choix de 4 abattoirs, non liés entre eux (producteurs n'appartenant pas au même groupement par exemple) permet de prélever des animaux provenant d'élevages différents et de groupements de producteurs ayant des pratiques d'élevage différentes. Chaque abattoir devait être visité trois fois afin de pouvoir étudier d'éventuel phénomène de persistance de souches de campylobacter dans l'environnement des abattoirs visités.

1.2 Réalisation pratique de l'étude : prélèvements en abattoirs

1.2.1 Caractéristiques des abattoirs visités

1.2.1.1 Localisation géographique

Les prélèvements ont été réalisés dans 4 abattoirs situés dans les régions Bretagne (département 56, Morbihan) et Pays de la Loire (département 53, Mayenne) d'août 2005 à juin 2006. Ces abattoirs sont situés dans les principales zones de production de volaille en France (figure 16).

1.2.1.2 Visites réalisées

Pour des raisons pratiques, seules 9 visites ont été réalisées dans les abattoirs. dont 8 visites sur 2 journées consécutives. L'abattoir 1 a été visité 3 fois, en août 2005, en février et en mars 2006. La visite de l'abattoir 1 en août 2005 n'a eu lieu que sur une seule journée (après le nettoyage et la désinfection de l'abattoir). L'abattoir 2 a été visité une fois, en septembre 2005. L'abattoir 3 possède deux chaînes d'abattage, une chaîne pour les petites volailles (poulets et pintades) et une chaîne pour les grosses volailles (dindes et canards). Sur la chaîne d'abattage des poulets, 3 visites ont été réalisées en décembre 2005, en février et en mai 2006. Sur la chaîne d'abattage des dindes, une visite a été réalisée en juin 2006. L'abattoir 4 a été visité une fois, en janvier 2006. La saison et les dates des prélèvements sont précisés dans le tableau 18.

Tableau 19. Capacité (nombre d'animaux abattus par an) et cadence (nombre d'animaux abattus par heure) des abattoirs visités pour les poulets

Abattoir	Capacité en 2004	Capacité en 2005	cadence mini	cadence maxi
1	12 361 564	11 847 610	7000	8000
2	8 584 105	9 365 592	7000	8000
3	13 303 048	14 808 937	6800	6800

Tableau 20. Capacité (nombre d'animaux abattus par an) et cadence (nombre d'animaux abattus par heure) des abattoirs visités pour les dindes

Abattoir	Capacité en 2004	Capacité en 2005	Capacité en 2006	cadence mini	cadence maxi
1	nc	1 175 741	402 986	1500	2000
3	1 831 065	nc	nc	1500	1800
4	nc	3 308 960	420 852	1400	3200

nc : non communiqué

1.2.1.3 Activité des abattoirs visités

➤ Espèces de volailles abattues

Les abattoirs 1, 2 et 3 abattent plusieurs types de volailles, ce sont des abattoirs multi-espèces. L'abattoir 4 n'est équipé que pour l'abattage des dindes. L'abattoir 2 n'abat pas de dindes.

Les abattoirs 1 et 2 n'ont qu'une chaîne d'abattage. Dans ces deux abattoirs, des poulets (de type standard, fermier ou des poules de réforme), des pintades et des dindes sont abattus sur la même chaîne. Pour les volailles de petite taille, la chaîne est entièrement automatisée. Pour les dindes, l'abattage et la plumaison sont automatisés. L'éviscération et la finition sont réalisées manuellement.

L'abattoir 3 possède deux chaînes d'abattage en fonction de la taille des volailles abattues. Cependant, comme pour l'abattoir 1, l'abattage des petites volailles est entièrement automatisé, et l'abattage des dindes et des canards est partiellement manuel.

➤ Capacité et cadence d'abattage

Les capacités et cadence des abattoirs visités sont indiquées dans les tableaux 19 et 20. En France, les abattoirs de volailles sont très standardisés, la taille de l'abattoir n'a pas de conséquences sur les procédés d'abattage ou les procédures de nettoyage et désinfection. D'après le guide Orsol Volailles-oeuf (Anonymous 2005), pour la filière poulet, 47 abattoirs ayant une capacité supérieure à 4.5 millions de têtes abattent 88% des volumes. Les abattoirs visités pour les poulets appartiennent à cette catégorie avec des capacités en 2005 de 9 à 15 millions. La cadence des abattoirs varie de 6800 à 8000 pour les poulets. Pour la filière dinde, en 2005, 7 abattoirs en France avaient une capacité supérieure à 4.5 millions de têtes abattues par an, et ces 7 abattoirs abattent 43% des volumes contrôlés. La taille des abattoirs en filière dinde varie beaucoup plus que dans la filière poulet et les abattoirs que nous avons visités ont des capacités qui varient de 1 à 3 millions d'animaux abattus par an.

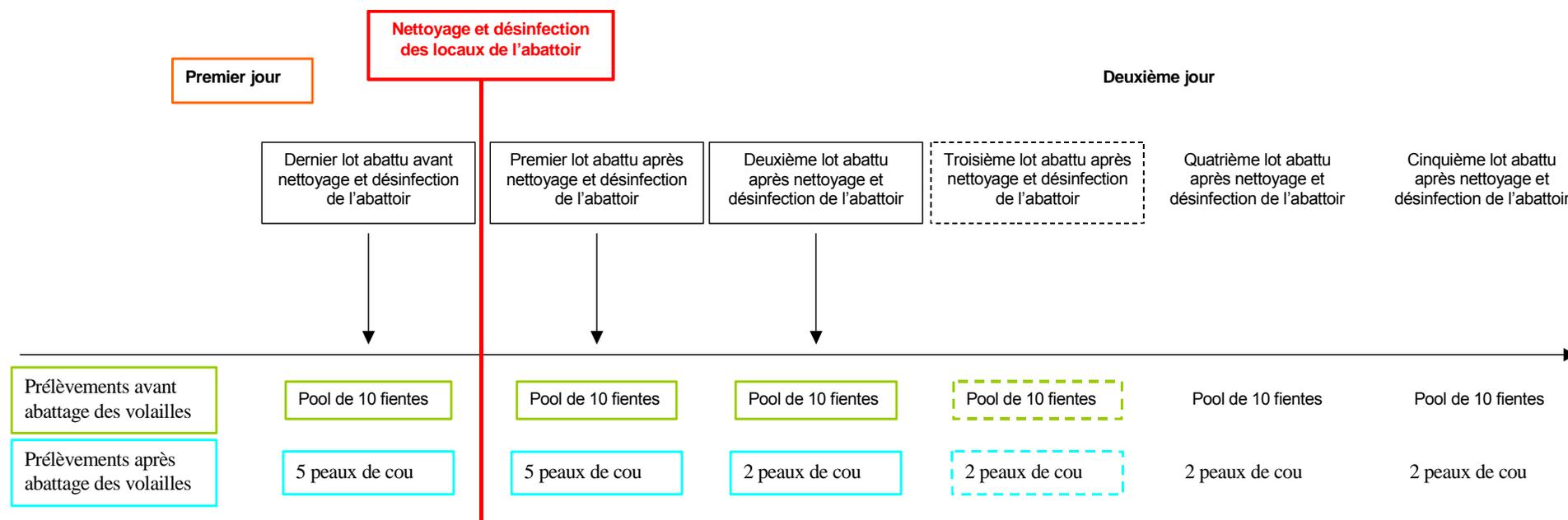
1.2.1.4 Procédures de nettoyage et désinfection appliquées dans les abattoirs

Dans chaque abattoir, un questionnaire portant sur les produits de nettoyage et désinfection utilisés et leurs modalités d'utilisation a été transmis au responsable qualité de l'abattoir. Le questionnaire détaille l'ensemble des zones où sont réalisées des opérations de nettoyage et de désinfection, c'est à dire, les caisses de transport des animaux, les locaux et le matériel de la chaîne d'abattage. L'objectif de ce questionnaire est de déterminer quelles sont les molécules désinfectantes utilisées dans les abattoirs de volailles visités. Pour chaque zone traitée dans l'abattoir, le nom des produits utilisés, leur concentration et le temps de contact sont demandés. L'abattoir 2 n'a pas répondu au questionnaire. Le questionnaire est en annexe 1.

1.2.2 Prélèvements réalisés

L'objectif de notre étude est d'étudier l'impact des procédures de nettoyage et de désinfection et des procédures d'abattage sur la résistance aux antibiotiques des campylobacters. Les prélèvements ont donc été faits avant et après nettoyage et désinfection, dans les caisses de transport des animaux et dans les locaux de l'abattoir et sur les animaux, avant l'abattage et avant l'entrée en ressuage des carcasses.

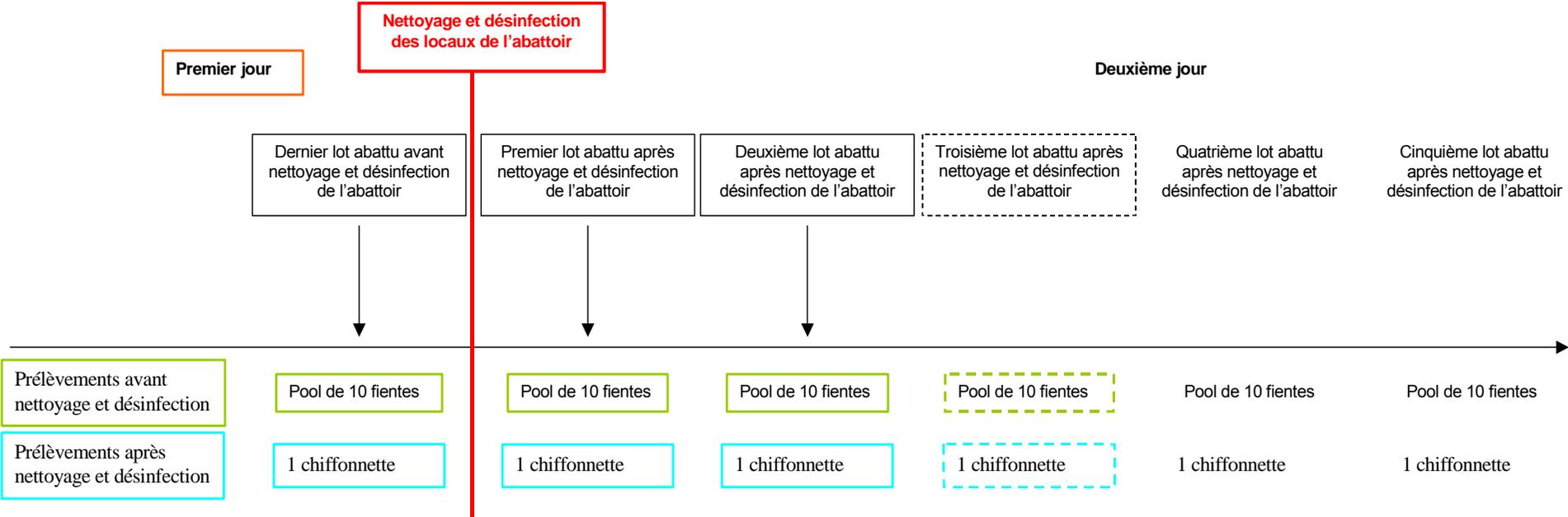
Figure 17. Schéma récapitulatif des prélèvements réalisés sur les volailles



Légende :

Prélèvements réalisés en fonction de l'activité de l'abattoir et de la taille des lots

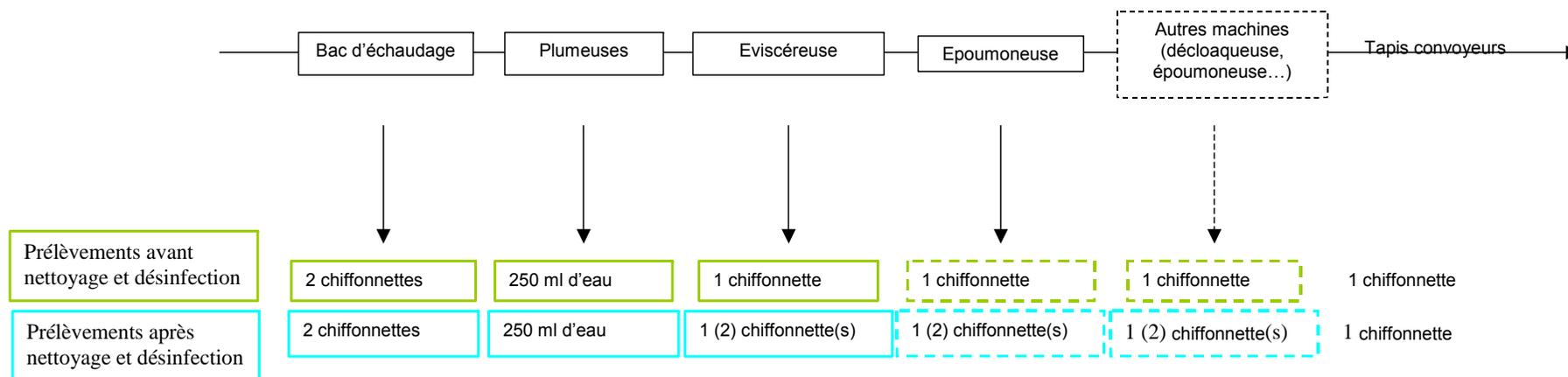
Figure 18. Schéma récapitulatif des prélèvements réalisés dans les caisses de transport



Légende:

Prélèvements réalisés en fonction de l'activité de l'abattoir et de la taille des lots

Figure 19. Schéma récapitulatif des prélèvements sur la chaîne d'abattage



Légende :

┌ Prélèvements réalisés en fonction de la structure de la chaîne d'abattage et des machines de l'abattoir ┐

1.2.2.1 Organisation des prélèvements

➤ Prélèvements sur les volailles

Les volailles ont été prélevées par lot. Dans notre étude, un lot correspond à un groupe de volailles provenant d'un même élevage, et abattues en même temps.

- Fiche sanitaire d'élevage

La fiche sanitaire d'élevage est un document établi par l'éleveur, transmis au responsable de l'abattoir qui s'assure que les services d'inspection vétérinaire en disposent au moins 24 h avant la date prévue d'abattage des animaux. Sur cette fiche sont portés l'ensemble des traitements (antibiotiques, anti-inflammatoires, vermifuges...) reçus par les animaux pendant la période d'élevage. Pour chaque lot, la fiche sanitaire d'élevage était récupérée lorsqu'elle était disponible.

- Prélèvements avant l'abattage des animaux

Les prélèvements avant l'abattage correspondent à des fientes. Pour des raisons de faisabilité, les fientes sont prélevées avec des gants dans les caisses de transport au moment de l'accrochage des volailles. Pour chaque lot, un pool de 10 fientes prises dans différentes caisses de transport du lot est prélevé. Les prélèvements de fientes sont placés dans des pots de prélèvements stériles de 250 ml.

- Prélèvements après l'abattage des animaux

Les prélèvements après abattage correspondent à des peaux de cou qui sont prélevées avant que les carcasses n'entrent en salle de ressuage. Les peaux de cou sont découpées soit directement sur la chaîne lorsque les carcasses restent sur une chaîne pour entrer en salle de ressuage (c'est en général le cas de volailles de petite taille), soit sur les tapis convoyeurs lorsque les carcasses sont placées sur des chariots à épinette puis emmenées en salle de ressuage. Pour chaque peau de cou, les prélèvements sont réalisés avec un bistouri et une pince stériles qui sont changés pour chaque prélèvement. Les peaux de cou sont ensuite placées dans des sacs stomacher stériles (figure 17).

➤ Prélèvements sur le matériel

- Chiffonnettes utilisées

Les surfaces des caisses de transport et des machines de la chaîne d'abattage sont prélevées avec des chiffonnettes (Sodibox, Nevez, France). Ce sont des chiffonnettes stériles dans un sachet de prélèvement soudé, imprégnée d'un milieu neutralisant pour les désinfectants (dont la composition est fournie en annexe 2), prêtes à l'emploi en emballage unitaire avec deux gants stériles.

- Caisses de transport

Pour chaque lot de volailles, les caisses de transport sont prélevées avant et après nettoyage et désinfection. Les caisses de transport des volailles sont nettoyées et désinfectées après chaque utilisation. Avant nettoyage et désinfection, les prélèvements correspondent aux fientes fraîches prélevées dans les caisses de transport au moment de l'accrochage des volailles (les prélèvements ne sont pas faits en double, il s'agit du même prélèvement que celui réalisé pour les prélèvements animaux). Après nettoyage et désinfection, une chiffonnette est passée sur la surface d'au moins 5 caisses de transport par lot prélevé (figure 18).

Tableau 21. Nombre de lots prélevés dans les quatre abattoirs

Abattoir	Visite n°	Type de volaille	Nombre de lots	FSE
1	1	Poulet standard	5	-
		Dinde	2	+
	3	Poulet standard	4	+
		Dinde	2	+
		Poulet standard	4	+
Sous-total abattoir 1		17		
2	1	Poulet standard	3	+
		Poulet fermier	1	+
		Autre	2	-
Sous-total abattoir 2		6		
3	1	Poulet fermier	2	+
		Autre	3	+
	2	Poulet standard	2	+
		Poulet fermier	2	+
		Autre	1	+
	3	Poulet standard	2	+
		Poulet fermier	2	+
		Autre	1	+
	4	Dinde	3	+
		Autre	1	+
	Sous-total abattoir 3		18	
4	1	Dinde	1	+
Sous-total abattoir 4			1	
Sous-total par type de volaille		Poulet standard	20	
		Poulet fermier	7	
		Dinde	8	
		Autre	8	
Total			43	

FSE : fiche sanitaire d'élevage

Tableau 22. Nombre de prélèvements sur les volailles et dans les caisses de transport en fonction du type de volaille

Type de volaille	Pool de 10 fientes	Caisse de transport après nettoyage et désinfection	Peaux de cou
Poulet standard	20	20	61
Poulet fermier	7	7	23
Dinde	8	8	31
Autre	8	8	31
Total	43	43	146

- Chaîne d'abattage

Le nettoyage et la désinfection des locaux et de la chaîne d'abattage dans les abattoirs sont réalisés quotidiennement dans les abattoirs, à la fin de la journée de travail. Pour les locaux et la chaîne d'abattage, les prélèvements sont réalisés sur deux journées successives : le premier jour, à l'arrêt des machines à la fin de l'activité, avant le nettoyage et la désinfection et le deuxième jour, avant la remise en route de la chaîne, après le nettoyage et la désinfection. Sur les doigts des plumeuses, les machines à éviscérer et les tapis convoyeurs, les prélèvements sont réalisés avec des gants stériles et des chiffonnettes. Dans les plumeuses, les chiffonnettes sont passées sur les doigts en caoutchouc des plumeuses sur au moins 10 doigts différents. Au cours du prélèvement des plumeuses, les rotors sont tournés pour exposer les différents doigts. Pour les machines, les chiffonnettes sont passées vigoureusement sur l'ensemble des surfaces accessibles de la machine, pendant au moins 30 secondes. Dans le bac d'échaudage, le prélèvement de 250 ml d'eau est fait dans un pot stérile. Ces prélèvements sont réalisés avant et après nettoyage et désinfection sur les mêmes sites. Dans certains cas, après nettoyage et désinfection, deux chiffonnettes sont utilisées sur la même machine (figure 19).

1.2.2.2 Nombre de lots de volailles prélevés

Dans chaque abattoir, 5 peaux de cou sont prélevées sur le dernier lot abattu avant nettoyage et désinfection de l'abattoir (premier jour) et sur le premier lot abattu après nettoyage et désinfection (deuxième jour). Le deuxième jour, après le premier lot abattu après nettoyage et désinfection, 1 à 4 lots de volailles sont prélevés, en fonction de l'activité de l'abattoir et de la taille des lots. Pour les lots suivants, 2 peaux de cou sont prélevées par lot (figure 17). Le nombre de lots prélevés par abattoir est indiqué dans le tableau 21.

1.2.2.3 Nombre de prélèvements réalisés

➤ Prélèvements sur les volailles et dans les caisses de transport

Le tableau 22 indique le nombre de prélèvements réalisés sur les volailles (fientes et peaux de cou) et dans les caisses de transport de chaque lot après nettoyage et désinfection.

➤ Prélèvements sur l'équipement de la chaîne d'abattage

Le tableau 23 indique le nombre de prélèvements réalisés sur les machines de la chaîne d'abattage et dans le bac d'échaudage avant et après nettoyage et désinfection

Au total, 346 prélèvements ont été faits dans les 4 abattoirs, dont 189 prélèvements sur les volailles avant et après abattage et 157 prélèvements d'environnement avant et après nettoyage et désinfection (figure 20).

1.2.2.4 Conservation des prélèvements avant traitement

Tous les prélèvements sont conservés dans une glacière avec des blocs de glace, puis en chambre froide à 4°C jusqu'au traitement, sous 48h pour les prélèvements réalisés le premier jour et sous 24h pour les prélèvements réalisés le deuxième jour. Les abattoirs étant situés loin du laboratoire, les prélèvements n'ont pas pu être traités dans des délais plus courts.

Tableau 23. Nombre de prélèvements sur les machines et le bac d'échaudage en fonction des abattoirs

Abattoir	Site de prélèvement	Avant nettoyage et désinfection		Après nettoyage et désinfection	
		Prévus	Réalisés	Prévus	Réalisés
1	Machines	18	14 ¹	18-27	22 ¹
	Eau	3	2 ²	3	2 ²
2	Machines	6	6	6-9	9
	Eau	1	0 ²	1	0 ²
3	Machines	24	19 ³	24-36	19 ³
	Eau	4	4	4	4
4	Machines	6	6	6-9	6
	Eau	1	1	1	0 ⁴
Total	Machines	54	45	54-81	56
	Eau	9	7	9	6

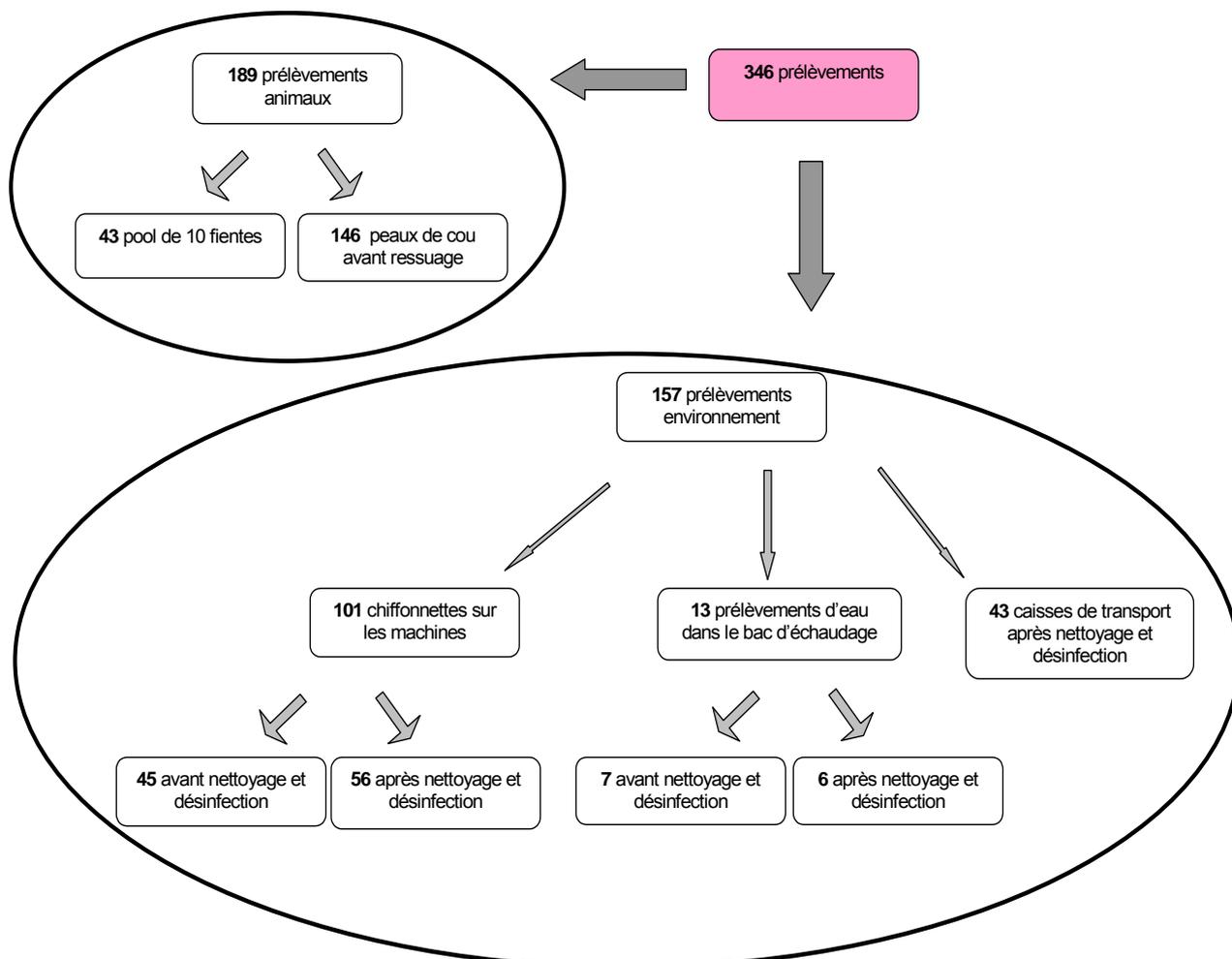
¹ : Dans l'abattoir 1, la première visite n'a été réalisée qu'après nettoyage et désinfection. Les prélèvements avant nettoyage et désinfection n'ont pas été réalisés.

² : Dans les abattoirs 1 et 2, l'eau du bac d'échaudage n'a pas été prélevée au cours de la première visite

³ : dans l'abattoir 3, la chaîne d'abattage des dindes présentait moins de sites de prélèvements que la chaîne d'abattage des poulets

⁴ : dans l'abattoir 4, il n'y avait pas d'abattage après les opérations de nettoyage et désinfection (journée d'arrêt de l'abattoir), par conséquent, le bac d'échaudage n'avait pas été rempli et le prélèvement d'eau du bac après nettoyage et désinfection n'a pas pu être réalisé

Figure 20. Synthèse des prélèvements réalisés



1.3 Analyse statistique

1.3.1 Analyse multidimensionnelle descriptive

1.3.1.1 Objectif de l'analyse multidimensionnelle descriptive

Les analyses multidimensionnelles descriptives sont des outils permettant de synthétiser et décrire les liens entre variables et entre individus. L'objectif général des analyses multidimensionnelles est de décrire un ensemble de données sur lequel on n'a pas ou peu d'information. Dans le cas des analyses multidimensionnelles descriptives, toutes les variables jouent le même rôle. Leur intérêt par rapport aux analyses mono-dimensionnelles est la prise en compte de l'information globale des variables. La règle générale de robustesse d'une analyse multidimensionnelle est que le nombre d'individus doit être supérieur au nombre de variables introduites.

1.3.1.2 Description des données qualitatives par l'Analyse des Correspondances Multiples (ACM)

L'objectif de notre étude est de décrire la variable de résistance (la variable qualitative étudiée est R ou S) des différents prélèvements réalisés qui sont caractérisés par :

- L'abattoir où ils ont été prélevés
- La saison de prélèvement
- Le type de volaille
- Le moment du prélèvement (avant ou après nettoyage et désinfection/avant ou après abattage)
- Les fiches sanitaires d'élevage des lots de volailles prélevés

L'intérêt de cette méthode est la prise en compte de toutes les résistances observées dans les prélèvements et de l'ensemble des informations disponibles sur l'origine des prélèvements.

Les variables étudiées sont qualitatives et quantitatives ce qui justifie le choix de l'analyse des correspondances multiples. L'ACM de nos données a été réalisée avec le logiciel SPAD® (Spad, Paris, France).

1.3.2 Comparaison des niveaux de résistance observés

1.3.2.1 Choix de la population de référence

Dans notre étude, la résistance aux antibiotiques est exprimée en pourcentage d'isolats résistants parmi la totalité des isolats ou en pourcentage de prélèvements comptant des isolats résistants parmi la totalité des prélèvements. Pour chaque prélèvement réalisé, en raison de la nature du protocole d'isolement, de 1 à 8 isolats peuvent être collectés.

En fonction des objectifs de l'analyse, la mesure du pourcentage de résistance sera faite soit sur l'ensemble des isolats collectés soit sur les résistances observées par prélèvement. Pour mesurer la résistance au sein d'un prélèvement, on notera pour chaque antibiotique si la résistance est observée ou non, ce qui permet de tenir compte du fait que plusieurs isolats dans un même prélèvement peuvent être issus d'un même clone. Cette méthode permet de limiter la pondération entraînée par les

prélèvements dans lesquels plusieurs isolats sont obtenus et elle correspond à une description des résistances aux antibiotiques présentes dans les prélèvements.

1.3.2.2 Comparaison des pourcentages de résistance observés

➤ Principe des tests de comparaison

Les tests de comparaison des pourcentages observés dans plusieurs échantillons permettent de répondre à la question : les populations dont sont issus les échantillons sont-elles identiques ou différentes ? Les comparaisons portent sur les prélèvements collectés et les isolats obtenus avant et après nettoyage et désinfection, et sur les prélèvements collectés et les isolats obtenus avant et après abattage des volailles. La comparaison teste deux hypothèses : l'hypothèse nulle H_0 qui considère à priori que les paramètres de populations d'où sont issus les échantillons (ou les isolats) sont identiques et l'hypothèse alternative H_1 qui est retenue au cas où les résultats du test conduiraient à rejeter l'hypothèse H_0 . Pour ces tests, deux risques sont calculés :

- le risque α qui est la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle H_0 alors que H_0 est vraie
- le risque β qui est la probabilité de ne pas rejeter H_0 alors que H_1 est vraie

Le risque α est fixé à priori, dans l'étude, ce risque est fixé à 5% et si l'on observe une différence, la différence observée est significative au risque $p \leq 0.05$.

La puissance du test est la valeur $1-\beta$. La puissance d'un test est liée à la taille des effectifs des échantillons. Plus la taille augmente, plus la puissance du test augmente et le risque β diminue. La puissance désirée pour l'étude peut également être fixée, par exemple à 80%, ce qui permet de calculer le nombre d'individus (dans l'étude, le nombre de prélèvements ou d'isolats) nécessaires.

➤ Tests de comparaison utilisés

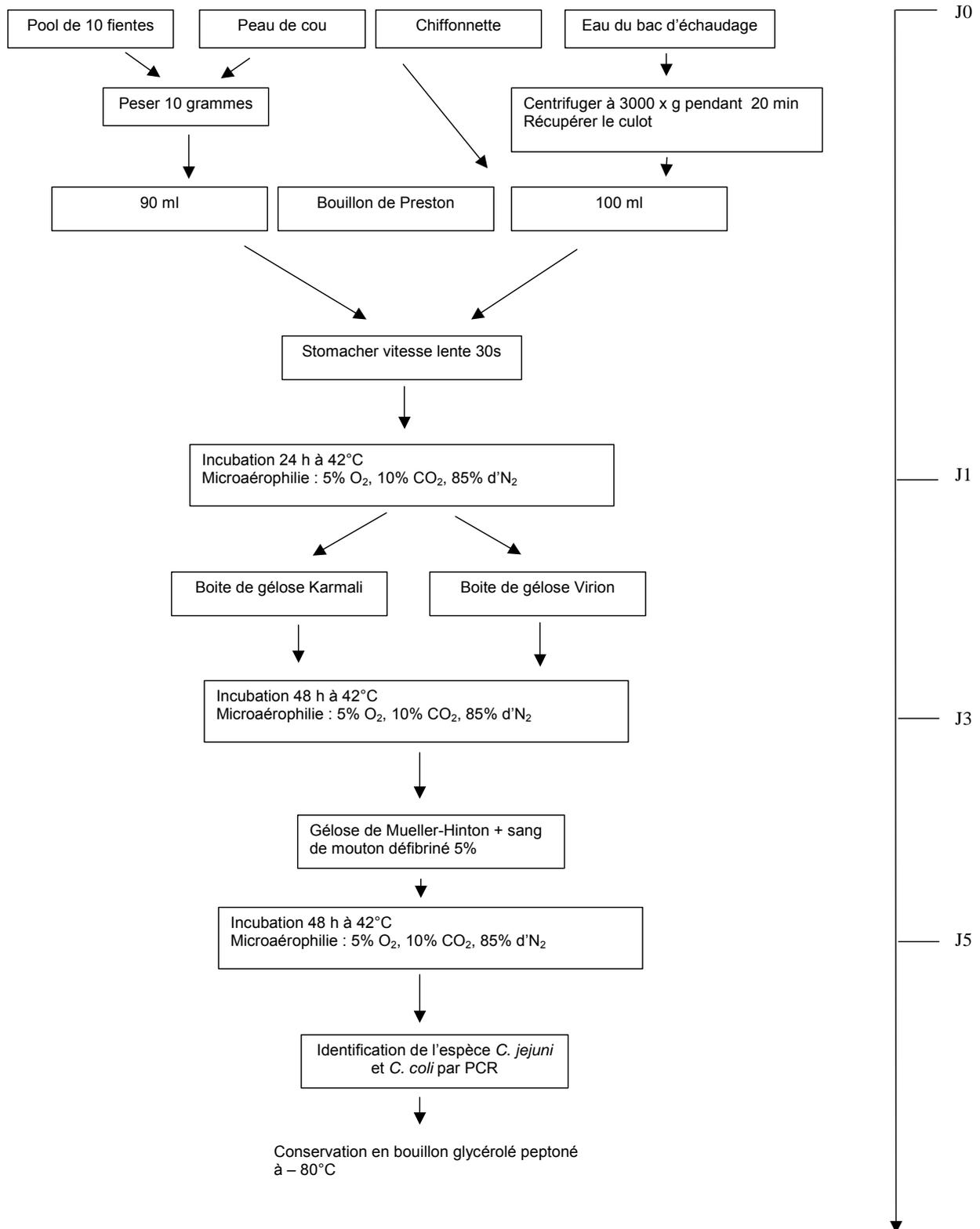
- Le premier test de comparaison utilisé est le test du χ^2 qui consiste à comparer les effectifs des classes de distribution. Pour ce test, des effectifs théoriques sont calculés, ils correspondent à l'effectif théorique qui serait observé si les distributions étaient identiques. Les conditions d'application de ce test nécessitent que les effectifs calculés théoriques soient supérieurs à 5.
- Lorsque la condition des effectifs calculés supérieurs à 5 n'est pas remplie, il existe une méthode de calcul exacte de tester l'homogénéité de 2 distributions de 2 variables binaires : le test exact de Fisher.

Les tests de comparaisons utilisés dans notre étude seront donc le test du χ^2 et le test exact de Fisher.

1.3.2.3 Corrélation entre les distributions de CMI

Les tests de corrélation sont utilisés afin de rechercher l'existence d'un lien entre la résistance aux antibiotiques et aux désinfectants des souches de campylobacter et de quantifier l'intensité de la liaison. Les distributions de CMI des antibiotiques sont (le plus souvent) bimodales, ce qui conduit à l'utilisation de tests non- paramétriques. Ils sont basés non pas sur la comparaison des valeurs de variables étudiées, mais sur les rangs des individus classés. On appelle rang, le numéro d'ordre d'une valeur après classement de la variable par ordre croissant. Dans notre étude, le test de

Figure 21. Isolement des campylobacters à partir des prélèvements réalisés en abattoir



corrélation utilisé est le test de corrélation des rangs de Spearman. Son interprétation est identique à celle du test de corrélation r ($p < 0.05$).

Dans notre étude, les tests de comparaisons et le calcul des corrélations ont été réalisés avec le logiciel Systat® (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

2 Méthodes de laboratoire

2.1 Isolement des campylobacters

L'ensemble de la procédure d'isolement des campylobacters est schématisée sur la figure 21. Dans toute l'étude, le milieu microaérophile correspond à une atmosphère composée de 5% de O₂, 10% de CO₂ et 85% d'N₂.

2.1.1 Traitement des prélèvements et phase d'enrichissement

Les isollements sont réalisés selon la méthode interne de l'AFSSA Ploufragan : Recherche de *Campylobacter* thermotolérants qui correspond à une méthode adaptée à partir de la norme NF ISO 10272. La composition des différents milieux utilisés au cours de l'étude est fournie dans l'annexe 3.

Tous les échantillons sont soumis à une phase d'enrichissement en bouillon de Preston avant l'isolement des campylobacters.

➤ Préparation des prélèvements

Pour les prélèvements de pool de fientes et pour les prélèvements de peau de cou, 10 g sont prélevés stérilement. Pour les prélèvements d'eau du bac d'échaudage, le prélèvement est centrifugé à 3000 x g pendant 20 min et le culot de centrifugation est récupéré.

➤ Ajout du bouillon de Preston

Le bouillon d'enrichissement de Preston est préparé avec un bouillon nutritif n°2 (Oxoid, Basingstoke, RU) complété avec le supplément sélectif pour campylobacter (Oxoid réf. SR0117E). Les échantillons de fientes et de peau de cou sont placés dans des sacs stomacher stériles avec 90 ml de bouillon d'enrichissement de Preston. Le culot de centrifugation du prélèvement d'eau du bac d'échaudage et les chiffonnettes sont placées dans des sacs stomacher stériles avec 100 ml de bouillon de Preston.

Tous les sacs sont agités en vitesse lente, avec un stomacher (BagMixer®, Interscience, Saint nom, France), pendant 30 s.

➤ Incubation

Les sacs stomacher contenant les prélèvements sont placés dans des jarres étanches avec des sachets générateurs de CO₂ (GenBox, Biomérieux, Marcilly l'Etoile, France), créant un milieu microaérophile, et sont mis à incuber dans une étuve maintenue à 37°C pour les prélèvements réalisés jusqu'en décembre 2005 puis à 42°C pour les prélèvements réalisés après cette date. L'incubation dure 18 à 24h en milieu microaérophile. A 37°C, de nombreuses boîtes s'avéraient faussement positives pour campylobacter. Les boîtes contenant les milieux sélectifs de *Campylobacter* présentaient des colonies caractéristiques macroscopiquement qui s'avéraient négatives en PCR. La température de 37°C permettait la croissance de bactéries du genre

Comamonas espèce *aquatica* (Wauters, De Baere et al. 2003). Cette bactérie avait également été identifiée au cours d'une étude par le centre technique Aerial et caractérisée par séquençage au centre national de référence des campylobacters. La mise en culture à 42°C permet d'éviter sa croissance et diminue le nombre de boîtes faussement positives pour campylobacter.

2.1.2 Milieux sélectifs utilisés

Tous les milieux de croissance gélosés sont distribués dans des boîtes de Pétri rondes de 90 mm de diamètre.

Après incubation, 10 µl des bouillons d'enrichissement sont ensemencés sur deux milieux sélectifs pour les campylobacters : le milieu de Karmali (Oxoid réf. CM935) complété avec le supplément sélectif de Karmali pour campylobacter (Oxoid réf. SR0167E) et le milieu de Virion. Les antibiotiques ajoutés dans le milieu de Virion sont fournis par Sigma Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). La composition de ces milieux est indiquée dans l'annexe 3. Les boîtes sont ensuite placées à incuber en condition microaérophile (5% O₂, 10% CO₂ et 85% N₂) dans une étuve à débit gazeux réglable pendant 48 h à 37°C pour les prélèvements réalisés jusqu'en décembre 2005 puis à 42°C par la suite.

2.1.3 Isolement

Après 48 h d'incubation des boîtes de Karmali et de Virion, deux colonies par boîte sont prélevées et ensemencées sur la gélose de Mueller-Hinton (Difco-Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) complétée avec 5% de sang de mouton défibriné (AES laboratories, Combourg, France). Ces boîtes sont placées à incuber à 42 °C pendant 48 h dans une étuve en milieu microaérophile.

2.1.4 Conservation des isolats de campylobacter

Les cultures pures de campylobacter peuvent être conservées pendant plusieurs années à -80°C en cryotubes de 1.8 ml dans du bouillon glycérolé peptoné. La composition du bouillon glycérolé peptoné est indiquée dans l'annexe 3.

2.2 Détermination de l'espèce *C. jejuni* et *C. coli* par amplification génique (PCR)

2.2.1 Préparation des échantillons à partir d'une colonie bactérienne isolée sur milieu gélosé

A partir des isolements de campylobacter obtenus, une colonie est prélevée et remise en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile (soit 10⁵ à 10⁶ bactéries par essai PCR).

Les tubes contenant les suspensions bactériennes sont incubés au bain-marie à sec à 95-100° C pendant 10 min puis transférés dans de la glace pendant au moins 10 min. Le choc thermique engendré casse les membranes des bactéries et libère l'ADN.

La PCR peut être réalisée immédiatement ou les échantillons dénaturés conservés à +4°C sont analysés le lendemain.

Tableau 24. Amorces utilisées pour l'identification des espèces *C. jejuni* et *C. coli* par PCR d'après (Denis, Soumet et al. 1999)

Gène cible	Amorces	Séquence (5'→3')	Température d'hybridation	Taille du produit (pb)
<i>mapA</i>	MDmapA1	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG	52°C	589
	MDmapA2	GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A		
<i>ceuE</i>	MDCOL3	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG	52°C	462
	MDCOL2	TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG		

2.2.2 Préparation du mélange PCR

Les réactions PCR sont réalisées sur l'appareil GenAmp™ 9700 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, USA). Les mélanges réactionnels sont réalisés dans un volume final de 50 µl pour une réaction PCR dans des microtubes Thin Walled PCR (Perkin Elmer). En concentration finale, les réactifs nécessaires sont :

- Tampon Gene Amp PCR Buffer II (sans MgCl₂) 1 X (Applied biosystem, Les Ulis, France) (Tris Hcl pH 8,3 : 10 mM, Kcl : 50 mM).
- Mélange de dNTP avec en final 200 µM de chaque dNTP.
- Solution de MgCl₂ (2,5 mM)
- Amorces, synthétisées par Sigma Aldrich, aliquotées à la concentration de 10 pmol/µl. Les amorces utilisées à la concentration de 0.42 µM. Les amorces issues du gène mapA sont spécifiques de *C. jejuni* et celles du gène ceuE sont spécifiques de *C. coli* (tableau 24).
- Amplitaq Gold (Perkin Elmer): 1.5 unités

Deux µl d'échantillon lysés sont ajouté à 48 µl du mélange PCR pour un volume final de 50 µl.

2.2.3 Conditions des cycles PCR

Le programme PCR comprend un cycle initial de 2 min à 95°C pour activer la polymérase, puis 35 cycles de 30 s à 94°C (dénaturation de la matrice), 30 s à 52°C (hybridation des amorces), 30 s à 72°C (polymérisation). Une extension finale est réalisée à 72°C pendant 5 min avant conservations des produits de la réaction à +4°C.

2.2.4 Electrophorèse des acides nucléiques

Les produits amplifiés sont analysés selon leur poids moléculaire par migration sur un gel d'agarose (agarose standard, Eurobio, France) 1% dans du tampon TBE 1X (Tris-borate EDTA ; Tris HCl 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM pH 8). Les dépôts sont de 10 µl de produits PCR additionnés à 2 µl de tampon de charge 6X (orange loading dye, Promega, Charbonnières les Bains, France). Un marqueur de poids moléculaire est également déposé pour déterminer approximativement la taille des fragments analysés. Il s'agit soit de 5 µl PCR Markers (Promega) ou 5 µl du 100 pb DNA ladder (Promega). A pH 8 (pH de la solution), l'ADN chargé négativement migre vers la cathode. Après migration à 3-4 volts/cm pendant 1 h 30, les produits sont colorés dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à 0.5 µg/ml. Ils sont visualisés sous UV et photographiés avec l'analyseur d'image Bio 1-D (Fisher Bioblock, Illkirch, France).

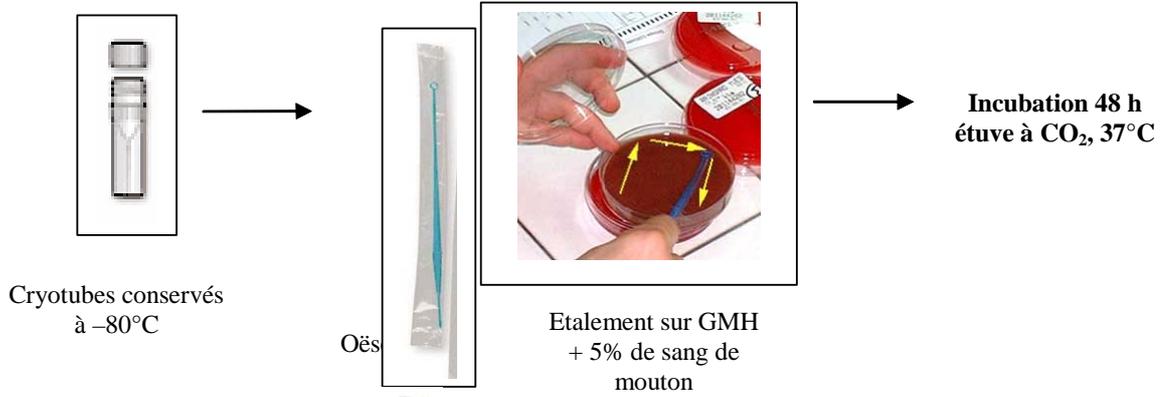
2.3 Mesure de la résistance aux antibiotiques

2.3.1 Antibiotiques testés

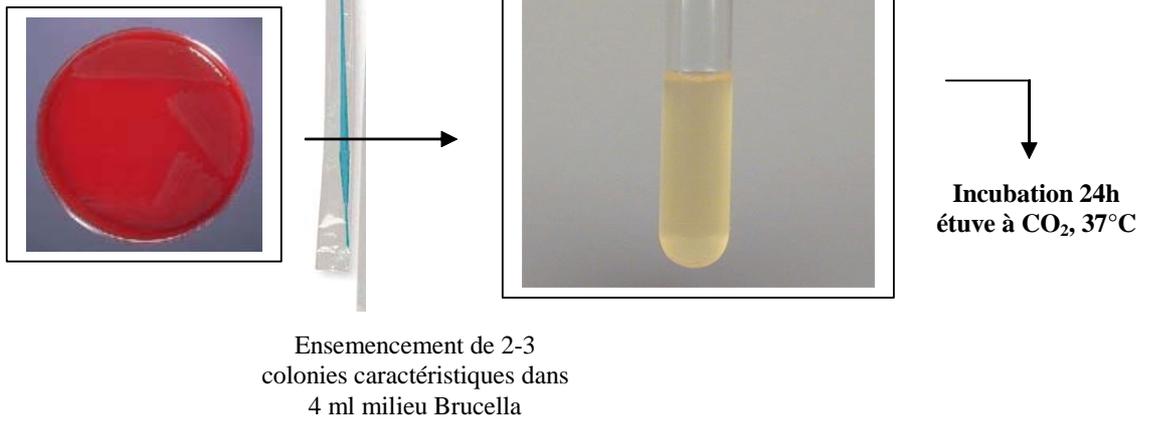
Les antibiotiques utilisés sont l'ampicilline (béta-lactamine), la tétracycline, l'érythromycine (macrolide), la gentamicine (aminoglycoside), l'enrofloxacin (quinolone 3^{ème} génération) et la streptomycine (aminoglycoside). Tous les antibiotiques sont commercialisés par Sigma (Saint Quentin, France).

Figure 22. Préparation des suspensions bactériennes pour la mesure de CMI

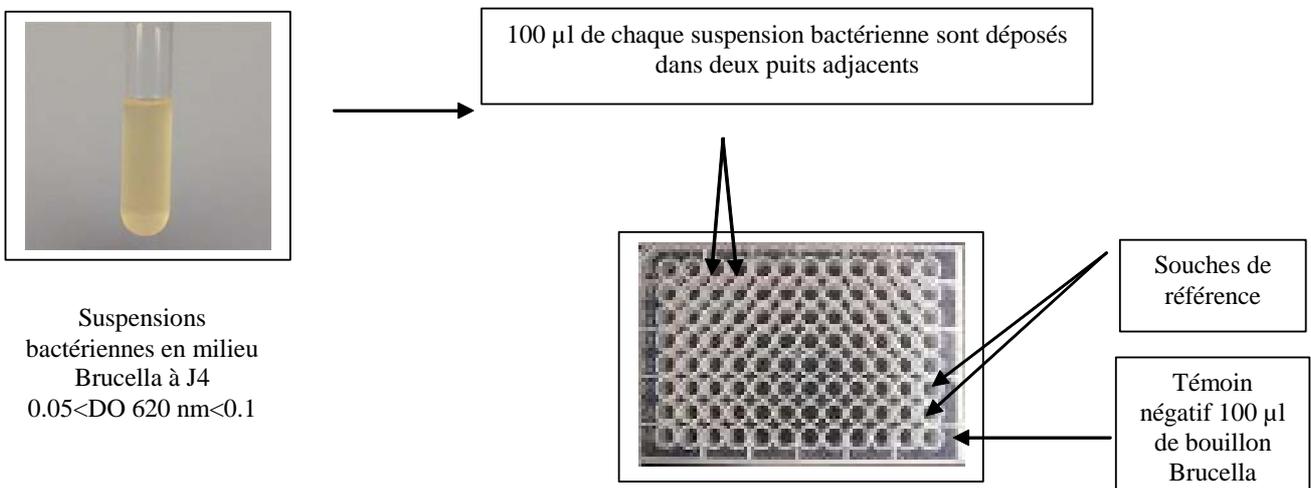
J₀ Isolement



J₂ Mise en suspension des colonies



J₃ Préparation des microplaques



2.3.2 Préparation des suspensions bactériennes pour la mesure des CMI (figure 22)

Les souches de campylobacter conservées à -80°C sontensemencées sur des boites de Pétri contenant une gélose de Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de mouton défibriné. Ces boites sont incubées dans l'étuve à CO_2 Heracell 240 (Kendro, Courtaboeuf, France) en milieu microaérophile à une température de 37°C pendant 48 h. Une colonie par boite est ensuite transférée dans un tube stérile contenant 4 ml de bouillon Brucella. Les tubes sont incubés dans l'étuve à CO_2 en milieu microaérophile à 37°C pendant 24 h. A partir de chaque tube, 200 μl de suspension bactérienne sont transférés dans une microplaque (Greiner, VWR International, Pessac, France) à 96 puits. Chaque microplaque contient également un témoin négatif (bouillon Brucella) et deux souches de référence : *C. jejuni* ATCC 35560 et *C. coli* ATCC 35559. Ces souches sont utilisées à chaque mesure de CMI.

2.3.3 Mesure de la concentration minimale inhibitrice par une méthode de dilution en milieu gélosé

2.3.3.1 Dénombrement des suspensions bactériennes

Après le transfert des suspensions bactériennes dans une microplaque de 96 puits, la densité optique (DO) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectracount[®], Packard Instruments, Rungis, France) à 620 nm et elle doit être comprise, pour chacun des puits, entre 0.05 et 0.1 ce qui correspond à 1.10^8 à 2.10^8 UFC/ml.

2.3.3.2 Préparation des géloses contenant les dilutions d'antibiotiques

Pour chaque antibiotique, une série de dilutions de facteur 2 est préparée suivant les recommandations du CLSI (anciennement NCCLS (M7-A6-Vol.23 N°2-Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; approved standard- Sixth Edition- Janvier 2003). La préparation des géloses contenant les antibiotiques est illustrée dans la figure 23. Les concentrations finales sont les suivantes : pour l'ampicilline de 2 à 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la tétracycline de 1 à 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$, l'érythromycine de 0.25 à 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la gentamicine de 0.25 à 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, l'enrofloxacin de 0.25 à 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et la streptomycine de 1 à 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.3.3.3 Ensemencement des géloses

Pour chaque série de concentrations testées, deux boites témoins de gélose GMH additionnée de 5% de sang sont préparées. Ces géloses ne contiennent pas d'antibiotiques et correspondent au témoin avant et après inoculation. A l'aide d'un multi-inoculateur, 1 à 2 μl des suspensions bactériennes de la microplaque sont déposés à la surface de la gélose (soit environ 10^5 bactéries par spot). La première boîteensemencée, témoin « 0-pré », permet de vérifier que les souches testées se multiplient. Les géloses sont ensuite inoculées dans l'ordre croissant des concentrations. Enfin, la dernière boîte de gélose inoculée, témoin « 0-post », permet de vérifier qu'il n'y a pas eu de transfert d'antibiotique par le biais de l'inoculateur entre chaque gélose. Les boites sont ensuite placées 48 h dans l'étuve à CO_2 .

Figure 23. Préparation des géloses contenant les antibiotiques ou les désinfectants

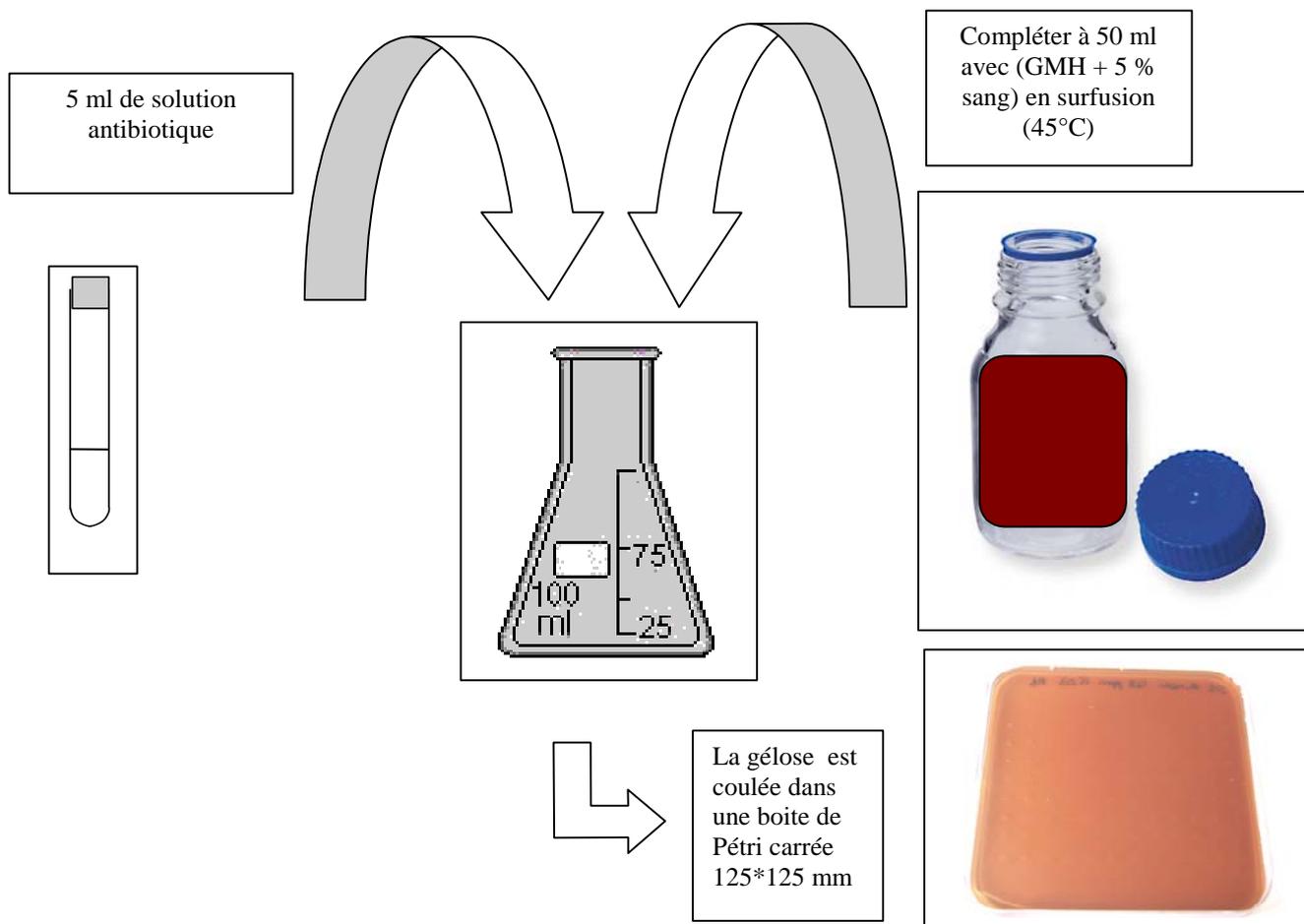


Tableau 25. Valeurs de CMI admises pour *C. jejuni* (ATCC 33560) par la technique de dilution en milieu gélosé. (NCCLS 2002)

Antibiotique	CMI en µg/ml
Ciprofloxacine	0.12-1
Erythromycine	1-8
Gentamicine	0.5-4
Acide nalidixique	8-32
Tétracycline	1-4

2.3.3.4 Lecture des résultats

On observe le développement bactérien. La CMI correspond à la première concentration pour laquelle on n'observe plus de croissance. Les résultats sont validés si :

- la densité optique du puits de la microplaque est comprise entre 0.05 et 0.1
- les CMI des souches de référence sont comprises dans la fourchette des valeurs admises pour ces souches (tableau 25)
- il n'y a pas de croissance dans les puits des témoins négatifs
- la même croissance pour les souches est observée sur les boîtes « 0 pré » et « 0 post ».

Toutes les mesures de CMI ont été faites deux fois afin de confirmer la valeur observée. Lorsque les mesures étaient discordantes, une troisième mesure était réalisée. Si la troisième mesure était également discordante, la CMI de la souche n'était pas retenue pour le reste de l'étude.

2.3.3.5 Contrôle des résultats de mesure des CMI

En 2004 et 2005, nous avons participé aux essais inter-laboratoire du programme ARBAO (antibiotic resistance in bacteria of animal origin) pour l'évaluation de la sensibilité de campylobacter aux antibiotiques par la méthode de dilution en milieu gélosé. Ces essais consistaient à analyser par an 8 souches de campylobacter (*C. jejuni* et *C. coli*) envoyé par le laboratoire de référence de l'Union européenne. Les résultats que nous avons obtenus correspondaient aux résultats attendus.

2.4 Mesure des CMI des désinfectants

Plusieurs techniques ont été utilisées pour mesurer la sensibilité des campylobacters aux désinfectants. Les résultats obtenus avec ces méthodes sont présentés dans le chapitre 3.

2.4.1 Désinfectants testés

Les désinfectants utilisés sont indiqués dans le tableau 26. Il s'agit de principes actifs de la famille des ammoniums quaternaires (le chlorure de didécyl-diméthyl ammonium CDDA (Bardac 22[®]) et le chlorure de benzalkonium CB (BTC 50[®])) et de la famille des chlorés avec l'hypochlorite de sodium (XY12[®]).

2.4.2 Dilution en milieu gélosé

La préparation est identique à celle des géloses contenant les concentrations d'antibiotiques (figure 23). Les gammes de concentrations finales de désinfectant sont les suivantes : CDDA et CB de 0.5 à 32 µg/ml en ammoniums quaternaires. Ce protocole ne peut pas être utilisé pour l'hypochlorite de sodium car le produit réagit avec la gélose (formation de mousse et modification de couleur).

2.4.3 Diffusion en milieu gélosé

Les composés chlorés réagissant très fortement avec le milieu de croissance, l'étude de la sensibilité des campylobacters à ce désinfectant a été réalisée avec une méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette méthode permet de limiter le contact entre le désinfectant et le milieu de croissance.

Tableau 26. Produits désinfectants utilisés pour la détermination des CMI

Nom déposé et fournisseur	Principe actif	% de principes actifs	Famille
Bardac 22® Lonza AG (Basel, Suisse)	Chlorure de N,N-didécyl-N,N-diméthylammonium (CDDA)	50	Ammoniums quaternaires
BTC 50® Stepan Europe (Voreppe, France)	Chlorure de N-alkyl-N,N-diméthyl-N-benzylammonium (CB)	50	Ammoniums quaternaires
XY12® Ecolab (Issy-les-Moulineaux, France)	Hypochlorite de sodium	12.5 à 15 en chlore actif	Composés chlorés

Figure 24. Diffusion en milieu gélosé pour l'étude de la sensibilité à l'hypochlorite de sodium

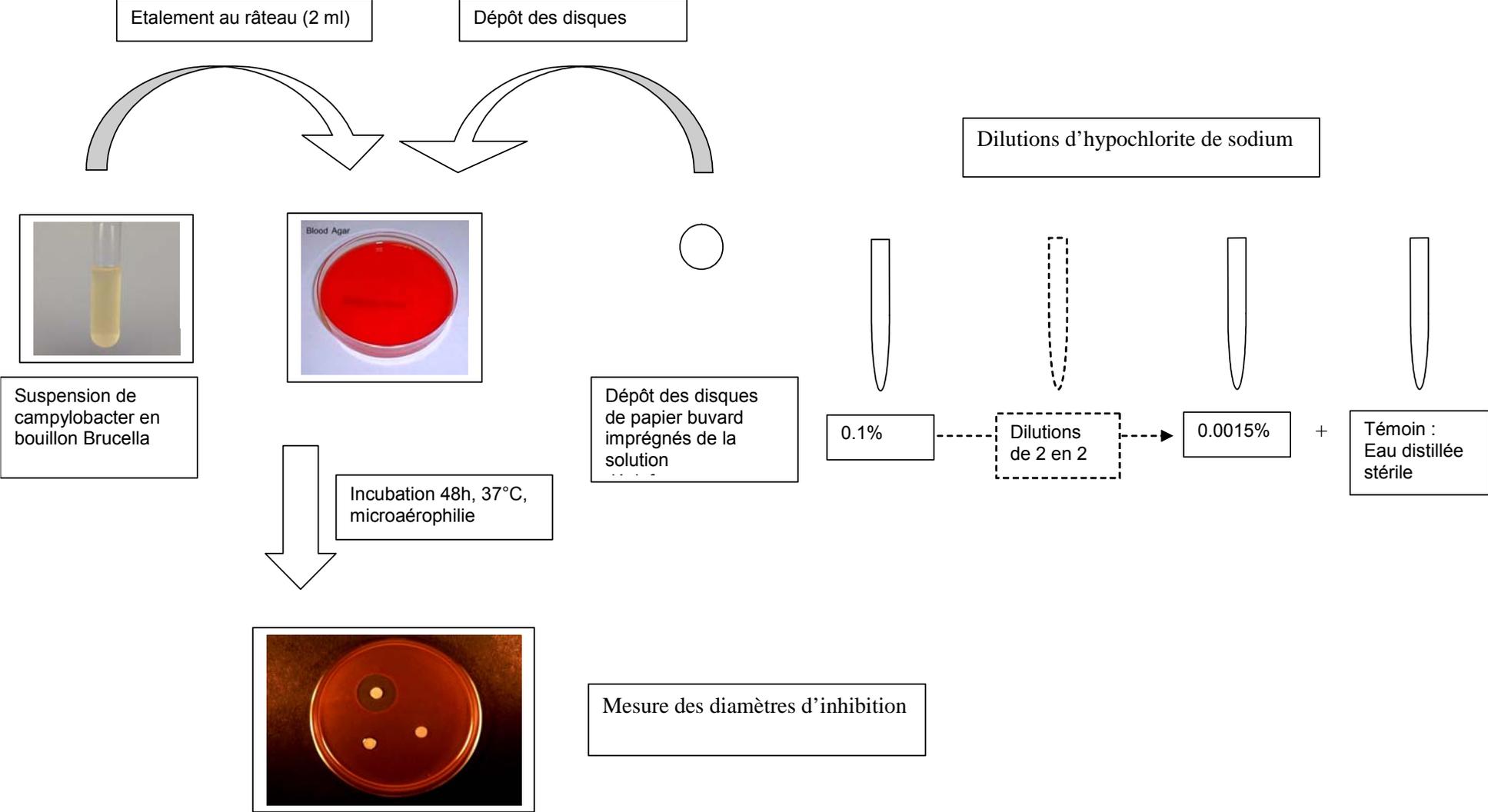


Tableau 27. Séquences des amorces des gènes *Pfla* et *gyrA* (Ragimbeau, Salvat et al. 1998)

Séquence amorce : 5'→3'	Identification	Taille des produits PCR (pb)
CTG GTT CTA GCC TTT TGG AAG C GGA CAC TTA GCG ATG CTA ACC A	GYR 1 GYR 2	2661
GAG CTT GTT TTA AAC ACG CGT GGT CGC TGA TAG TCA ATG GCC TTA GGT GCG	PFLA1 PFLA2	2026

Tableau 28. Mélange réactionnel pour la PCR des gènes *Pfla* et *gyrA*

	Concentration	Volume (µl) pour une réaction	Concentration finale
XL PCR buffer II (Perkin Elmer)	3.3 X	15.15	1 X
Mg(OAc) ₂ (Perkin Elmer)	25 mM	2	1 mM
Amorce PflA sens	20 µM	0.25	0.1 µM
Amorce PflA anti-sens	20 µM	0.25	0.1 µM
Amorce Gyr A sens	20 µM	2.5	1 µM
Amorce Gyr A anti-sens	20 µM	2.5	1 µM
dNTP (Perkin Elmer)	10 mM	4	200 µM
<i>rTth</i> polymerase XL (Perkin Elmer)	2 U/µl	1	2 U
Eau distillée stérile		Qsp 45 µl	

2.4.3.1 Principe

Des disques de papier buvard, imprégnés du désinfectant à tester, sont déposés à la surface d'une gélose de Mueller-Hinton complétée à 5% de sang de mouton défibriné, préalablement ensemencée avec une culture pure de la souche de campylobacter à étudier. Dès l'application des disques, le désinfectant diffuse en théorie de manière uniforme si bien que sa concentration est inversement proportionnelle au diamètre de la zone d'inhibition. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition ne dépendent uniquement que de la sensibilité du germe. A la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations de désinfectant égales aux CMI. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement ces valeurs. Toutefois, la sensibilité des souches les unes par rapport aux autres vis à vis de ce désinfectant peut être comparée par rapport à la taille du diamètre de la zone d'inhibition.

2.4.3.2 Protocole expérimental (figure 24)

Dans chaque boîte de Pétri, 2 ml de la suspension bactérienne en bouillon Brucella sont ensemencés avec un râteau. Le surplus est aspiré puis, dans chacune des boîtes, on place 4 disques de buvard stériles et sur chaque disque, on dépose 30 µl de chacune des concentrations que l'on veut tester. Les dilutions sont faites de deux en deux de 0.015% à 0.1% en chlore actif. Les boîtes sont ensuite placées à incuber pendant 48h à 37°C en milieu microaérophile. Les diamètres d'inhibition sont mesurés avec une règle graduée (en mm) après 48h d'incubation.

2.5 Typage moléculaire des campylobacters par PCR-RFLP des gènes polymorphes *Pfla/gyrA* et *flaA* d'après (Ragimbeau, Salvat et al. 1998)

2.5.1 Préparation de l'ADN bactérien pour la PCR

Les bactéries sont cultivées à 37°C sur une gélose de Karmali en microaérophilie pendant 48 h. A l'aide d'une öese, le tapis bactérien est prélevé et remis en suspension dans 2.5 ml de Tris NaCl (10 mM Tris-HCl et 1 M NaCl pH 7.6). Après centrifugation (5000 g, 5 min), les bactéries sont récupérées et lavées à 2 reprises avec 2 ml de Tris NaCl. L'ADN bactérien est extrait avec un kit d'extraction rapide (Dneasy Tissue Kit™, Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les extraits d'ADN sont conservés à +4°C. Des dilutions peuvent être nécessaires pour obtenir une DO de 0.1 à 260 nm (équivalent à 5 ng/µl). La réalisation pratique de la PCR est identique à celle utilisée pour l'identification des espèces *C. jejuni* et *C. coli*. Les amorces des gènes et les températures des cycles PCR ont été optimisées pour les gènes étudiés (Ragimbeau, Salvat et al. 1998).

2.5.2 Conditions de la PCR multiplex des gènes *gyrA* et *pflA*

Les séquences des gènes *Pfla* et *gyrA* sont indiquées dans le tableau 27.

Les réactifs nécessaires à la réaction de PCR des gènes *Pfla* et *gyrA* sont indiqués dans le tableau 28.

Tableau 29. Séquence des amorces du gène *flaA* (Ragimbeau, Salvat et al. 1998)

Séquence amorce : 5'->3'	Identification	Taille produits PCR (pb)
ATG GGA TTT CGT ATT AAC	Pg50	1448
GCA CCY TTA AGW GTR GTT ACA CCT GC	RAA19	

W : A+T ; Y : C+T ; R : A+G

Tableau 30. Préparation du mélange réactionnel pour la PCR du gène *flaA*

	Concentration	Volume (μ l) par réaction	Concentration finale
XL PCR buffer II (Perkin Elmer)	3.3 X	15.15	1 X
Mg(OAc) ₂	25 mM	2	1 mM
Amorce <i>flaA</i> 1	20 μ M	1	0.4 μ M
Amorce <i>flaA</i> 2	20 μ M	1	0.4 μ M
dNTP (Perkin Elmer)	10 mM	4	200 μ M chaque dNTP
<i>rTth</i> polymerase XL (Perkin Elmer)	2U/ μ L	1	2 U
Eau distillée stérile		Qsp à 45	

La matrice d'ADN nécessaire pour la réaction est de 25 ng d'ADN génomique (soit 5 µl d'une solution ADN à 5ng/µl). Le volume réactionnel final est de 50 µl.

Les paramètres d'amplification sont les suivants :

- Hotstart : 95°C – 3 min
- 18 cycles : 94°C 15 s – 60°C 30 s – ramp à 68°C 5 min
- 18 cycles : 94°C 15 s – 60°C 30 s – ramp à 68°C 6 min
- extension finale : 72°C – 10 min.
- maintient à +4°C

L'amplification a été réalisée sur le thermocycleur GenAmp™ 9700 (Applied Biosystems).

2.5.3 Conditions de la PCR du gène *flaA*

Les séquences des amorces du gène *flaA* sont indiquées dans le tableau 29.

Les réactifs nécessaires à la PCR du gène *flaA* sont indiqués dans le tableau 30.

La matrice d'ADN nécessaire pour la réaction est de 25 ng d'ADN génomique (soit 5 µl d'une solution ADN à 5ng/µl). Le volume réactionnel final est de 50 µl.

Les paramètres d'amplification sont les suivants :

- Hot start : 95°C – 60 s
- 30 cycles : 94°C 15 s – 45°C 30 s – ramp à 68°C 2 min
- extension finale : 72°C – 10 min
- maintient à +4°C

2.5.4 Séparation des produits amplifiés par électrophorèse en gel d'agarose

La présence des produits d'amplification est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose 1%. Cinq µl de produit PCR sont déposés et 3 µl du marqueur Raoul (Eurobio, Les Ulis, France). Après migration pendant 1h30 à 3V/cm et coloration avec une solution de BET (0.5µg/ml), ils sont visualisés et analysés à l'aide de l'analyseur Bio-Capt. Les tailles attendues sont :

- Pour le produit PCR du gène *gyrA* : 2661 pb
- Pour le produit PCR du gène *Pfla* : 2026 pb
- Pour le produit PCR du gène *flaA* : 1448 pb

2.5.5 Analyse par restriction enzymatique des produits de la PCR Multiplex et électrophorèse

2.5.5.1 Restriction enzymatique des produits PCR issus des gènes *Pfla* et *gyrA*

La restriction enzymatique est réalisée sur 8 µl de produits PCR *gyrA/PflA*. Les enzymes et les quantités utilisées sont :

- 5 U Hind III (10 U/µl, Q Biogene, Illkrich, France)
- 5 U Hinf I (10 U/µl, Q Biogene)
- 5 U Dde I (10 U/µl, Q Biogene)
- 5 U Hha I (10 U/µl, Q Biogene)

Le tampon 2 (Q Biogène) 1 X avec BSA (0.1 mg/ml) est ajouté et le tube est complété à 15 µl avec de l'eau distillée stérile. Il est placé pour l'incubation pendant 3 à 4 heures à 37°C au bain-marie.

2.5.5.2 Restriction enzymatique du produit du gène *flaA*

La restriction enzymatique est réalisée sur 8 µl de produits PCR *flaA*. L'enzyme utilisée pour la restriction est DdeI (10 U/µl, Q Biogene) et 5 U sont nécessaires pour la restriction.

Le tampon 3 (Q Biogène) 1 X avec BSA (0.1 mg/ml) est ajouté en final et le tube est complété à 15 µl avec de l'eau distillée stérile. Il est placé pour l'incubation pendant 3 à 4 h à 37°C au bain-marie.

2.5.6 Séparation des fragments PCR digérés par une électrophorèse en gel d'agarose à 2.5 %

Un gel d'agarose à 2.5 % est préparé dans le tampon TBE 1 X auquel est ajouté une solution de BET. Quinze µl de chaque échantillon sont déposés sur le gel d'agarose avec un marqueur de poids moléculaire tous les 6 puits (5 µl de marqueur φX174-HaeIII, Promega). L'électrophorèse dure 4 h à 3 V/cm.

Les temps de migration doivent être respectés pour avoir des résultats reproductibles et comparables entre les différentes souches testées.

2.5.7 Analyse des profils d'électrophorèse

Les images des gels sont capturées sous UV par un système vidéo Bio-Capt (Fisher Bioblock, Illkirch, France) et enregistrées sous le format Tif (pour être exploitables sous le logiciel Molecular Analyst Software FingerPrinting, Biorad – disponible à Ploufragan). Les profils électrophorétiques sont comparés en terme de positions communes ou différentes des bandes observées (Ragimbeau, Salvat et al. 1998; Rivoal, Denis et al. 1999).