



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Biologie Médicale

par

Janina DUDA-FERRAND

Le 21 octobre 2013

MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE DE DÉTECTION DE TRANSFERT D'UN PLASMIDE AU SEIN DU MICROBIOTE INTESTINAL MURIN

Examineurs de la thèse :

M. A. LOZNIEWSKI	PU-PH	Président
M. C. GANTZER	PU	Juge
M. C. RABAUD	PU-PH	Juge
Mme E. SCHVOERER	PU-PH	Juge
Mlle C. ALAUZET	MCU-PH	Juge
M. C. MERLIN	MCU	Juge

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE
Vice-Doyen « Pédagogie » : Mme la Professeure Karine ANGIOI
Vice-Doyen Mission « Sillon lorrain » : Mme la Professeure Annick BARBAUD
Vice-Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN
Assesseurs :

- 1 ^{er} Cycle :	Professeur Bruno CHENUEL
- 2 ^{ème} Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
- 3 ^{ème} Cycle :	
• « DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques »	Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
• « DES Spécialité Médecine Générale »	Professeur Paolo DI PATRIZIO
- Commission de Prospective Universitaire :	Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
- Développement Professionnel Continu :	Professeur Jean-Dominique DE KORWIN
- Filières professionnalisées :	M. Walter BLONDEL
- Formation Continue :	Professeur Hervé VESPIGNANI
- Recherche :	Professeur Didier MAINARD
- Relations Internationales :	Professeur Jacques HUBERT
- Universitarisation des études paramédicales et gestion des mono-appartenants :	M. Christophe NEMOS
- Vie Étudiante :	Docteur Stéphane ZUILY
- Vie Facultaire :	Mme la Docteure Frédérique CLAUDOT
- Étudiants :	M. Xavier LEMARIE

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

 Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY
 Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL - Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE
 Jean-Louis BOUTROY - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT - François CHERRIER
 Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS Jean
 DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER
 - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre
 HARTEMANN - Claude HURIET - Christian JANOT - Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre
 LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN Bernard LEGRAS - Jean-
 Pierre MALLIÉ - Michel MANCIAUX - Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE - Denise MONERET-VAUTRIN
 - Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN Gilbert PERCEBOIS - Claude
 PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL Jean PREVOT - Francis
 RAPHAEL - Antoine RASPILLER - Denis REGENT - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Daniel
 SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Claude SIMON - Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ -
 Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT- Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT Paul VERT - Colette
 VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

 Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Gérard BARROCHE Professeur Pierre BEY - Professeur Patrick BOISSEL - Professeur
 Michel BOULANGE - Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Jean-Pierre CRANCE

Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ - Professeure Simone GILGENKRANTZ
Professeure Michèle KESSLER - Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD
Professeur Michel PIERSON - Professeur Michel SCHMITT - Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel STRICKER
Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeure Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET
Professeur Michel WAYOFF

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET – Professeur Christo CHRISTOV

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)

Professeur Michel CLAUDON – Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et Mycologie)

Professeure Marie MACHOUART

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER – Professeure Eliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY - Professeur Didier PEIFFERT

Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Gérard AUDIBERT
Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeure Marie-Reine LOSSER

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE
Professeur Luc TAILLANDIER - Professeur Louis MAILLARD

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN
Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLÉ

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeure Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIÈRE

Professeur Nicolas SADOUL - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT – Professeur Thierry FOLLIGUET

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeure Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY - Professeur Athanase BENETOS

Professeure Gisèle KANNY – Professeure Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET

Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO – Professeure Rachel VIEUX

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

- 3^{ème} sous-section : (*Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale*)
Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Olivier MOREL
- 4^{ème} sous-section : (*Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale*)
Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

- 1^{ère} sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)
Professeur Roger JANKOWSKI – Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER
- 2^{ème} sous-section : (*Ophtalmologie*)
Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeure Karine ANGIOI

- 3^{ème} sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)
Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeure Muriel BRIX

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

- 1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)
Docteur Bruno GRIGNON – Docteure Manuela PEREZ
- 2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)
Docteur Edouard BARRAT - Docteure Françoise TOUATI – Docteure Chantal KOHLER
- 3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)
Docteure Aude MARCHAL – Docteur Guillaume GAUCHOTTE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

- 1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)
Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE
- 2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médecine*)
Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

- 1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)
Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN
Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA
- 2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)
Docteur Mathias POUSSEL – Docteure Silvia VARECHOVA
- 3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)
Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

- 1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)
Docteure Véronique VENARD – Docteure Hélène JEULIN – Docteure Corentine ALAUZET
- 3^{ème} sous-section : (*Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales*)
Docteure Sandrine HENARD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)
Docteur Alexis HAUTEMANIERE – Docteure Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN
2^{ème} sous-section (Médecine et Santé au Travail)
Docteure Isabelle THAON
3^{ème} sous-section (Médecine légale et droit de la santé)
Docteur Laurent MARTRILLE
4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)
Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE
2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique))
Docteure Lina BOLOTINE
4^{ème} sous-section : (Génétique)
Docteur Christophe PHILIPPE – Docteure Céline BONNET

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE
3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)
Docteure Françoise LAPICQUE – Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE
1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)
Docteure Anne-Christine RAT
3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)
Docteure Anne-Claire BURSZEJN
4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)
Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE
3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)
Docteur Fabrice VANHUYSE
4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)
Docteur Stéphane ZUILY

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE
1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)
Docteure Laure JOLY

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION
5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)
Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE
Docteure Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES
Monsieur Vincent LHUILLIER

19^{ème} Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE
Madame Joëlle KIVITS

60^{ème} Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL
Monsieur Alain DURAND

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL
Monsieur Jean REBSTOCK

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Monsieur Nick RAMALANJAONA

65^{ème} Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE
Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA - Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

66^{ème} Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteure Sophie SIEGRIST - Docteur Arnaud MASSON - Docteur Pascal BOUCHE

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston
(U.S.A)

Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)

Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)

Université de Pennsylvanie (U.S.A)

Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de
Kyoto (JAPON)

Professeure Maria DELIVORIA-
PAPADOPOULOS (1996)

Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)

Université d'Helsinki (FINLANDE)

Professeur James STEICHEN (1997)

Université d'Indianapolis (U.S.A)

Professeur Duong Quang TRUNG (1997)

Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)

Professeur Daniel G. BICHET (2001)

Université de Montréal (Canada)

Professeur Marc LEVENSTON (2005)

Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)

Université de Dundee (Royaume-Uni)

Professeur Yunfeng ZHOU (2009)

Université de Wuhan (CHINE)

Professeur David ALPERS (2011)

Université de Washington (U.S.A)

Professeur Martin EXNER (2012)

Université de Bonn (ALLEMAGNE)

A notre Maître et Président de Thèse

Monsieur le Professeur Alain Lozniewski

Professeur de Bactériologie, Virologie et Hygiène Hospitalière

Vous me faites le très grand honneur de présider cette thèse, de l'encadrer et de juger ce travail.

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre soutien dans l'élaboration de cette thèse.

Je vous remercie pour votre aide, vos conseils avisés et votre bienveillance tout au long de ma formation.

Veuillez accepter mes remerciements et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge

Monsieur le Professeur Christophe Gantzer

Professeur de Microbiologie Environnementale à la Faculté de Pharmacie

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce sujet.

Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma reconnaissance.

A notre Maître et Juge

Monsieur le Professeur Christian Rabaud

Professeur de Maladies Infectieuses et Tropicales

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce sujet.

Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma reconnaissance.

A notre Maître et Juge

Madame le Professeur Evelyne Schvoerer

Professeur de Bactériologie, Virologie et Hygiène Hospitalière

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce sujet.

*Lors de mon semestre dans votre service, j'ai pu apprécier votre accueil, votre disponibilité
et la qualité de vos enseignements.*

Veillez accepter mes remerciements et soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge

Madame le Docteur Corentine Alauzet

Maître de conférences en Bactériologie, Virologie et Hygiène Hospitalière

Tu as accepté de juger ce travail pour mon plus grand honneur.

*Je te remercie pour m'avoir épaulée au cours de ces dernières années avec beaucoup de
bienveillance et de disponibilité.*

*Merci pour ton encadrement et tes conseils avisés tout au long de l'élaboration de cette
thèse et de mon Master 2.*

*Puisse ce travail être le reflet de mon profond respect, de ma gratitude et de toute ma
sympathie.*

A notre Maître et Juge

Monsieur le Docteur Christophe Merlin

Maître de conférences de Microbiologie environnementale et moléculaire

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

Je vous remercie de m'avoir épaulée dans l'élaboration de mon Master 2.

Vous m'avez suivie avec beaucoup de bienveillance et de disponibilité.

Merci pour tous vos conseils avisés.

Veillez accepter l'expression de ma profonde gratitude et de toute ma sympathie.

Tous mes remerciements

A toutes les personnes qui m'ont aidée pour mener à bien ce travail, et particulièrement

A Mademoiselle Hélène Guilloteau

A Monsieur le Professeur Jean-Pol Frippiat

A Madame le Docteur Christine Legrand-Frossi

A Madame le Docteur Armelle Ropars

A Mademoiselle Fanny Geigner

A Monsieur Guillaume Harlé

A Madame Anne-Marie Carpentier

Je vous remercie de l'intérêt que vous avez exprimé pour ce travail, de toute votre aide et de vos conseils au cours de nos différentes rencontres.

Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et de toute ma sympathie.

A toutes les personnes rencontrées au cours de mon internat, dans les différents services et tout particulièrement à **l'Equipe Technique du service de Bactériologie**, pour la transmission de vos connaissances mais aussi pour votre bonne humeur et vos qualités humaines.

Des remerciements pour les **Docteurs Nejla Aissa, Marie-Christine Conroy, Catherine Laurain, Hubert Tronel et Tahar Hadou** pour votre compagnonnage tout au long de ma formation, vos conseils avisés et votre bienveillance.

A Philippe

*Sans toi tout cela n'aurait pas été possible.
Merci pour ton soutien permanent et tes encouragements.
Un grand merci pour tes relectures attentives et tes remarques très pertinentes.*

A Hugo.

A mes parents, à Magda, Gustaw et Pawel.

A toute ma famille.

SERMENT

« **A**u moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque ».

Plus ratio quam vis

Table des matières

Table des figures	20
Table des tableaux.....	22
Liste des abréviations	23
I. Introduction.....	24
A. Emergence des entérobactéries multirésistantes : le « péril fécal » du XXI ^{ème} siècle	24
1. Antibiotiques et antibiorésistance : un cercle infernal.....	24
2. Entérobactéries multirésistantes : état des lieux	25
3. Emergence de <i>Escherichia coli</i> BLSE CTX-M : le « péril fécal ».....	28
B. Intestin : réservoir de gènes de résistance	31
1. Réservoir intrinsèque	31
2. Réservoir extrinsèque	32
C. Transfert horizontal de gènes dans le tractus gastro-intestinal.....	33
1. Vecteurs et mécanismes impliqués dans le transfert de gènes	33
2. Facteurs influençant le transfert de gènes.....	38
3. Exemples de transferts horizontaux de gènes <i>in vivo</i>	39
D. Méthodes d'étude de transfert horizontal de gènes	42
1. Les différentes méthodes de détection des événements de transfert	43
2. Les différents modèles permettant d'étudier le transfert de gènes <i>in situ</i>	47
II. Problématique et objectifs du travail.....	49
III. Matériel et méthodes.....	50
A. Modèle animal.....	50
1. Modèle murin.....	50
2. Stratégie expérimentale	50
B. Cultures bactériennes et conjugaisons.....	53
1. Choix du plasmide et des bactéries donneuses pour l'étude de TGH <i>in vivo</i>	53
2. Souches bactériennes et milieux de culture utilisés.....	55
3. Conjugaison bactérienne.....	56
4. Vérification des transconjugants par PCR et microscopie à épifluorescence.....	57
C. Biologie moléculaire	57
1. Extraction et purification de l'ADN total à partir du matériel fécal murin	57
2. Evaluation de la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les ADN extraits	59
3. Extraction d'ADN à partir de souches bactériennes pures	61
4. Détection des souches bactériennes donneuses (DH5α et Δ <i>fli</i>) et du plasmide pB10 par qPCR	62
D. Cytométrie en flux.....	65
1. Préparation des échantillons	65
2. Analyse des échantillons par cytométrie en flux	66
E. Analyses statistiques.....	67
IV. Résultats.....	68
A. Bactéries vectrices des plasmides.....	68
B. Suivi du plasmide pB10 et de ses souches donneuses par qPCR dans les fèces murines	70
1. Sélection d'une méthode d'extraction et de purification d'ADN total à partir de fèces murines.....	70
2. Suivi de pB10 ::mini-Tn-gfp1 et de <i>E. coli</i> DH5α par qPCR.....	77

3. Elaboration d' « amorces/sondes » spécifiques pour la détection de <i>E. coli</i> Δfli par qPCR	80
C. Suivi de pB10 ::mini-Tn-gfp1 et de sa donneuse par cytométrie en flux.....	89
1. Mises au point de la détection de <i>E. coli</i> DH5 α (pB10 ::mini-Tn- <i>gfp1</i>) par cytométrie en flux	89
2. Détection de DH5 α (pB10::mini-Tn5- <i>gfp1</i>) dans les fèces de souris inoculées...	93
3. Mises au point de la détection de <i>E. coli</i> Δfli (pB10 :: <i>rfp</i>)	95
V. Discussion	97
VI. Conclusion – perspectives	99
VII. Bibliographie	100

Table des figures

Figure 1. Evolution des résistances aux antibiotiques	24
Figure 2. <i>Escherichia coli</i> résistants aux C3G en 2002 et en 2011.....	26
Figure 3. Densités d'incidence des SARM et des EBLSE entre 2003 et 2010 en France.	27
Figure 4. Nombre de signalements des EPC en France entre janvier 2004 et avril 2013.....	27
Figure 5. Répartition géographique des différents groupes de BLSE CTX-M.....	28
Figure 6. Dissémination internationale des EPC NDM-1	29
Figure 7. Détection des gènes <i>bla</i> _{CTX-M} dans les sols agricoles de Bourgogne	30
Figure 8. Facteurs favorisant l'émergence des BLSE CTX-M	30
Figure 9. Analyse métagénomique de l'antibiorésistance dans les communautés microbiennes.	32
Figure 10. Voies de dissémination des gènes d'antibiorésistance	33
Figure 11. Mécanismes impliqués dans les transferts horizontaux de gènes.	34
Figure 12. Représentation hiérarchique des éléments génétiques mobiles	35
Figure 13. Structure d'une séquence d'insertion et d'un transposon.	35
Figure 14. Structure d'un intégron et mécanisme de recombinaison de cassettes.	36
Figure 15. Réponse SOS et transfert des gènes de shigatoxine (SXT)	39
Figure 16. Gènes de résistance communs aux bactéries à Gram négatif et à Gram positif.	40
Figure 17. Etude de TGH par l'approche basée sur la culture en milieu sélectif	43
Figure 18. Principe d'étude de TGH par qPCR	44
Figure 19. Etude des transferts de gènes par une approche basée sur la fluorescence	45
Figure 20. Détection des transconjugants par la cytométrie en flux.	46
Figure 21. Stratégie expérimentale établie pour l'inoculation et l'échantillonnage de souris.	53
Figure 22. Structure génétique du plasmide pB10	54
Figure 23. Expression de la GFP chez <i>Escherichia coli</i> DH5α (pB10::mini-Tn5gfp1).....	68
Figure 24. Aspect des colonies de <i>E. coli</i> Δ <i>fli</i> (pB10::rfp) sur milieu gélosé.....	69
Figure 25. Double fluorescence de <i>Escherichia coli</i> Δ <i>fli</i> (pB10::rfp) (LBM13).	69
Figure 26. Intégrité des ADN extraits avec les sept méthodes testées.....	74
Figure 27. Charge bactérienne des ADN extraits par différentes méthodes testées.	75
Figure 28. Nombre de copies de <i>nimI</i> , <i>vanD</i> et ITS détecté dans les fèces.	76
Figure 29. Nombre de copies de <i>nimI</i> , <i>vanD</i> et ITS détecté dans les contenus intestinaux.....	76
Figure 30. Sensibilité de la méthode de détection de DH5α et de pB10 dans les fèces murines.....	77
Figure 31. Détermination de la limite de détection de pB10 et de DH5α sur ADN cible pur.....	78
Figure 32. Evolution des quantités de pB10::mini-Tn-gfp1 et de DH5α dans des ADN totaux de fèces de souris inoculées par la souche vectrice CM363.	79
Figure 33. Comparaison d'un fragment de séquence de <i>E. coli</i> Δ <i>fli</i> par BlastN..	80
Figure 34. Amorces et sondes conçues pour la détection spécifique de <i>E. coli</i> Δ <i>fli</i> par qPCR.	81
Figure 35. Migration sur gel d'agarose de produits PCR obtenus avec les amorces « fli »	81
Figure 36. Estimation de l'efficacité de la qPCR avec les combinaisons sonde/amorces « fli5 » ...	82
Figure 37. Estimation de l'efficacité de la qPCR avec les combinaisons sonde/amorces « fli3 » ...	82
Figure 38. Optimisation de la concentration des amorces pour la détection de <i>E. coli</i> Δ <i>fli</i>	84
Figure 39. Optimisation de la concentration de la sonde pour la détection de <i>E. coli</i> Δ <i>fli</i>	84
Figure 40. Concentration d'ADN matrice optimale pour la détection de <i>E. coli</i> Δ <i>fli</i> par qPCR.....	85
Figure 41. Sensibilité globale de la méthode de détection de Δ <i>fli</i> (pB10) dans les fèces murines....	86
Figure 42. Evolution des quantités de pB10::rfp et de Δ <i>fli</i> dans des ADN totaux de fèces de souris inoculées par la souche vectrice LBM13.	88

Figure 43. Définition de l'évènement cellulaire non marqué et du bruit de fond en CMF.....	89
Figure 44. Cytogrammes obtenus pour <i>E. coli</i> DH5 α (pB10::mini-Tn- <i>gfp1</i>).....	90
Figure 45. Définition des fenêtres d'acquisition	90
Figure 46. Fiabilité des énumérations des évènements fluorescents selon le protocole 1..	92
Figure 47. Cohérence des énumérations selon le protocole 2	93
Figure 48. Influence du conditionnement des échantillons sur le nombre d'évènements détectés... ..	94
Figure 49. Suivi du nombre d'évènements fluorescents après inoculation de <i>E. coli</i> CM363.	95
Figure 50. Cytogrammes et diagrammes obtenus pour une suspension de <i>E. coli</i> LBM13	96

Table des tableaux

Tableau 1. EGM porteurs de gènes d'antibiorésistance chez des bactéries intestinales.....	37
Tableau 2. Exemples d'études de transferts d'EGM <i>in vivo</i> à partir des bactéries à Gram négatif..	41
Tableau 3. Exemples d'études de transferts d'EGM <i>in vivo</i> à partir des bactéries à Gram positif...	41
Tableau 4. Résumé des caractéristiques expérimentales de différentes études de TGH <i>in vivo</i>	56
Tableau 5. Souches bactériennes.	58
Tableau 6. Caractéristiques des méthodes d'extraction d'ADN comparées.	59
Tableau 7. Caractéristiques du mélange réactionnel et du programme de PCR quantitative.	59
Tableau 8. Amorces ciblant le gène de l'ADNr 16S..	60
Tableau 9. Caractéristiques du mélange réactionnel et du programme de PCR classique.	60
Tableau 10. Amorces ciblant ITS, <i>nimI</i> et <i>vanD</i>	61
Tableau 11. Sondes et amorces utilisées pour la détection de <i>pB10</i> par qPCR.....	62
Tableau 12. Sondes et amorces utilisées pour la détection de <i>DH5α</i> par qPCR.....	62
Tableau 13. Sondes et amorces utilisées pour la détection de Δfli par qPCR.	64
Tableau 14. Tailles des génomes utilisées pour établir les gammes étalons	65
Tableau 15. Protocoles de préparation des surnageants de fèces pour l'analyse en CMF.....	66
Tableau 16. Comparaison des techniques fluorimétriques et spectrophotométriques.	71
Tableau 17. Résultats des extractions d'ADN des fèces avec les méthodes testées.....	72
Tableau 18. Résultats des extractions d'ADN des contenus caecaux avec les méthodes testées.	72
Tableau 19. Fiabilité des énumérations des événements définis par la fenêtre R1.....	91

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
Amx	amoxicilline
BLSE	bêta-lactamase à spectre étendu
Cm	chloramphénicol
EBLSE	entérobactéries productrices de BLSE
EPC	entérobactéries productrices de carbapénémases
FAM	6-carboxyfluorescéine
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ICE	<i>integrative and conjugative elements</i>
IS	sequence d'insertion (<i>insertion sequence</i>)
In	intégron
kb	kilobases
Km	kanamycine
LB	<i>lysogeny broth</i>
LCPME	Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement
Mb	megabases
µm	micromètres
Nal	acide nalidixique
pb	paire de bases
PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PSM	poste de sécurité microbiologique
qPCR	réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
Rif	rifampicine
SEM	erreur standard de la moyenne (<i>standard error of the mean</i>)
Str	streptomycine
Sul	sulfamide
TAE	tampon Tris-acetate-EDTA
TAMRA	6-carboxytétraméthylrhodamine
Tet	tétracycline
Tm	triméthoprim
Tn	transposon
TSS	gélose trypticase – soja avec 5% de sang de mouton
UFC	unité formant colonie

I. Introduction

A. Emergence des entérobactéries multirésistantes : le « péril fécal » du XXI^{ème} siècle

1. Antibiotiques et antibiorésistance : un cercle infernal

Les antibiotiques ne sont pas une invention humaine. Ces molécules et les mécanismes assurant leur neutralisation ont une origine environnementale datant de millions d'années (Stokes & Gillings 2011).

En effet, dans les milieux très compétitifs, certains microorganismes (e.g. *Streptomyces* spp., *Nocardia* spp., *Actinomadura* spp., *Penicillium* spp.) produisent des antibiotiques naturels permettant l'inhibition des concurrents (Baquero et al. 2013; Baquero & Cantón 2009). Pour éviter une auto-toxicité, ces microorganismes présentent une antibiorésistance intrinsèque. En parallèle, leurs compétiteurs, eux aussi, élaborent ou acquièrent des gènes de résistance (e.g. *Kluyvera* spp. et sa bêta-lactamase à spectre étendu naturelle), assurant ainsi une homéostasie des communautés microbiennes (Cordero et al. 2012). Dans l'environnement, on a donc un large réservoir de gènes de résistance, pour majorité inconnus, appelés « résistome intrinsèque », auquel les microorganismes ont facilement accès par le transfert horizontal de gènes (Rolain 2013).

Or, l'homme s'est emparé depuis peu des antibiotiques, sans prendre en compte ce bagage évolutionnaire. En effet, leur utilisation massive en clinique et en agriculture a provoqué une sélection et une diffusion rapide des gènes de résistance au sein des populations microbiennes, notamment vers des bactéries pathogènes pour l'Homme (Hawkey & Jones 2009).

Comme l'illustre la Figure 1, seulement huit ans en moyenne séparent l'introduction d'un nouvel antibiotique et la description de premiers cas cliniques de résistance (Schmieder & Edwards 2012).

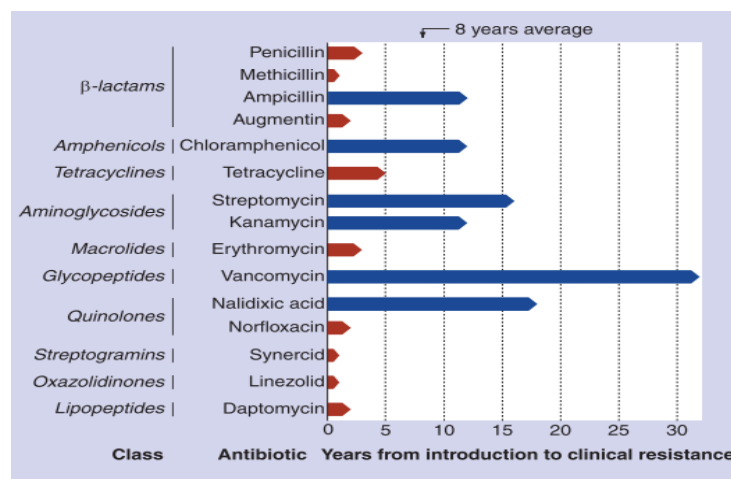


Figure 1. Evolution des résistances aux antibiotiques (Schmieder & Edwards, 2012).

Dans le cas des entérobactéries, l'introduction des pénicillines semi-synthétiques dans les années 1960, a été rapidement suivie par l'apparition de souches sécrétant des bêta-lactamases de classe A d'Ambler, à spectre étroit, avec le site actif à serine, nommées TEM-1, TEM-2 et SHV-1 (Jacoby 2009, Bush & Jacoby 2010). Codées par des gènes plasmidiques, ces enzymes ont disséminé vers différentes espèces d'entérobactéries (Jacoby 2009). La résistance à l'amoxicilline et aux céphalosporines de première génération qu'elles entraînent a favorisé la prescription des aminoglycosides, des quinolones et surtout des céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G).

Or, cette exposition aux C3G a suscité l'apparition dans les années 1980 de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), enzymes de classe A, détruisant la plupart de bêta-lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes (Jacoby 2009). Les premières BLSE ont été décrites chez *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia marcescens* et dérivait de pénicillinases SHV et TEM par modification de quelques acides aminés (Bush 2013). Ces nouvelles bêta-lactamases étaient également codées sur des plasmides et transférables par conjugaison (cf. paragraphe IC1). Par la suite, plusieurs centaines de variants de ces enzymes ont été décrits à travers le monde (Bush 2013). Ces BLSE étaient à l'origine de nombreuses épidémies hospitalières, impliquant principalement des souches de *K. pneumoniae* et d'*Enterobacter aerogenes* et, dans une moindre mesure, d'autres espèces d'entérobactéries (Haut Conseil de Santé Publique 2010).

Dans les années 1990 sont apparues des nouvelles BLSE, nommées CTX-M (Cantón et al. 2012). Les gènes de ces BLSE, les *bla*_{CTX-M}, dérivait des gènes de résistances chromosomiques naturels *bla*_{KLU} retrouvés dans les *Kluyvera* spp. appartenant à la flore intestinale humaine (Cantón et al. 2012). Plus de 130 variants de CTX-M ont depuis été décrits, hébergés le plus souvent par *Escherichia coli* suivie de *K. pneumoniae* (Bush 2013). Ces nouvelles BLSE ont diffusé non seulement au sein de souches hospitalières mais aussi communautaires (Haut Conseil de Santé Publique 2010). Parallèlement, des gènes de résistance aux fluoroquinolones et aminoglycosides (e.g. *qnr* ou *aac*(6')-Ib-cr) ont diffusé au sein de ces mêmes populations bactériennes suite à une large utilisation de ces antibiotiques.

Ainsi, les prescripteurs ont eu recours aux bêta-lactamines de dernière génération : les carbapénèmes. Leur utilisation a été rapidement suivie par l'apparition des souches productrices de carbapénémases, tout particulièrement chez *K. pneumoniae*, puis chez d'autres espèces d'entérobactéries. Ces carbapénémases sont de différents types : des métallo-β-lactamases (IMP, VIM, NDM), des bêta-lactamases de classe A (KPC, GES, SME) et de classe D (OXA-48) (Bush & Jacoby 2010). Comme *bla*_{CTX-M}, leurs gènes dérivent probablement de gènes de résistance naturels. Il a été montré, par exemple, que *bla*_{OXA48} a été mobilisé à partir de *Shewanella oneidensis*, une bactérie environnementale retrouvée dans les sédiments d'un lac (Poirel et al. 2004).

Ce cercle infernal, a donc abouti, durant ces cinquante dernières années, à l'émergence des souches multirésistantes, hautement résistantes, voire toto-résistantes (Magiorakos et al. 2012). Cette situation fait craindre la fin de l'ère des antibiotiques (Carlet et al. 2012).

2. Entérobactéries multirésistantes : état des lieux

L'émergence de souches bactériennes multirésistantes constitue donc actuellement une menace majeure en termes de santé publique, puisqu'elle peut aboutir, à courte échéance, à des impasses thérapeutiques.

Pendant longtemps, les cocci à Gram positif (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline – SARM ; Enterococci résistants aux glycopeptides - ERG) étaient au cœur des préoccupations de la communauté scientifique. Ces bactéries multi-résistantes (BMR) étaient surtout responsables des épidémies hospitalières des années 1990 et 2000 (Lucet & Birgand 2011). Des mesures d'hygiène, visant principalement la transmission manuportée, ont permis d'endiguer partiellement ce phénomène. Mais, depuis la fin des années 2000, malgré les précautions d'hygiène introduites dans le système hospitalier, on a constaté une émergence d'entérobactéries multirésistantes.

Pour les entérobactéries BLSE, à l'heure actuelle, les données épidémiologiques rassemblées par le réseau EARSS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) montrent les points suivants :

- une augmentation de la prévalence des *E. coli* résistantes aux C3G dans de nombreux pays passant, par exemple, de moins de 5% en 2002 à plus de 30% en 2011 au Portugal et en Grèce et de 2,9% à 19,8% en Italie (Figure 2) ;
- une proportion des souches BLSE parmi les *E. coli* isolés des bactériémies dépassant 15 à 20 % dans de nombreux pays du sud et de l'est de l'Europe ;
- une forte progression des souches productrices de BLSE parmi les *K. pneumoniae* : de 2 % à plus de 20 % entre 2002 et 2011 en France. Cette tendance est notée dans tous les autres pays européens ;
- une multirésistance (C3G, fluoroquinolones et aminosides) restant inférieure à 5% dans la plupart de pays, mais dépassant 10 % en Bulgarie, Grèce, Italie, Roumanie, Slovaquie et atteignant 18% à Chypre.

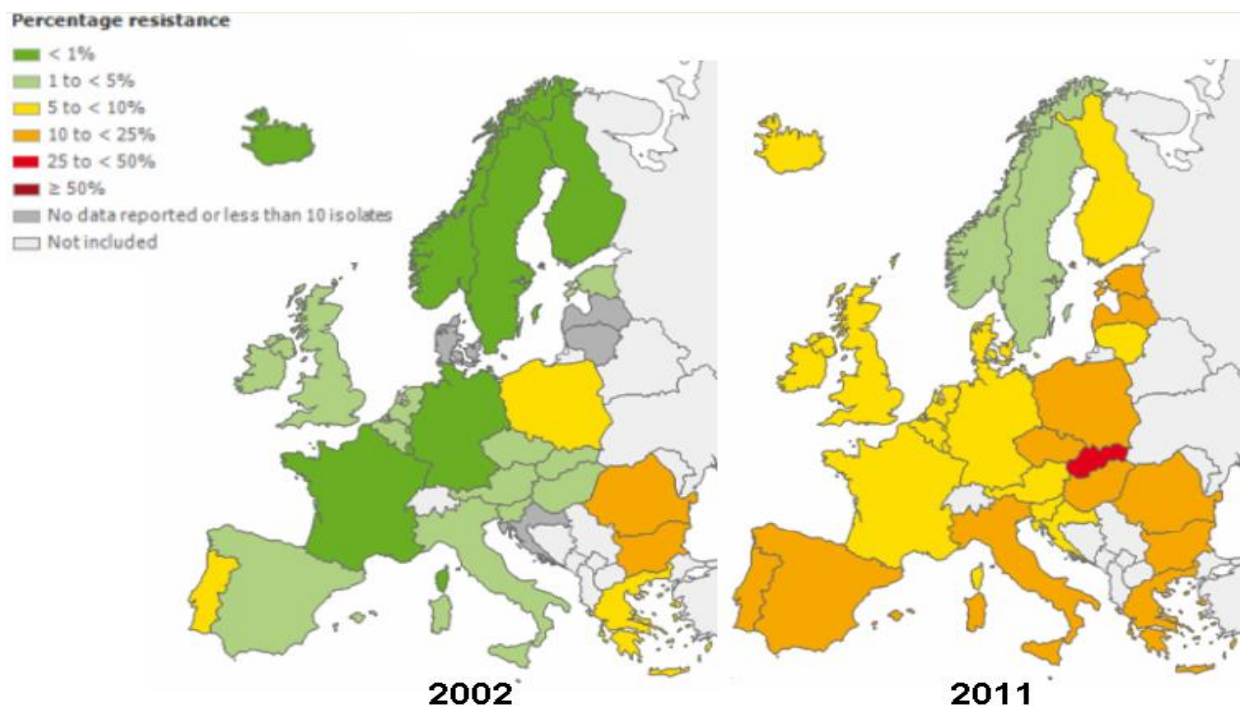


Figure 2. *Escherichia coli* résistant aux céphalosporines de troisième génération en 2002 et en 2011 (modifié d'après EARSS-Net)

En France, les données issues du réseau national de surveillance des BMR (BMR Raisin) font également apparaître une augmentation rapide de l'incidence des EBLSE avec :

- une augmentation du taux de densité d'incidence d'EBLSE de 0,17 à 0,48 par 1000 jours d'hospitalisation (JH) entre 2004 et 2010. Ce taux dépasse à présent celui des SARM sur lesquels, pendant longtemps, se focalisait l'attention des autorités sanitaires (Figure 3).
- une prédominance de *E. coli* BLSE qui représentent maintenant près de 60 % parmi les espèces d'entérobactéries BLSE. *K. pneumoniae* et *E. aerogenes*, autrefois prédominantes, correspondent seulement à 11,3 et 3,6 % des EBLSE.

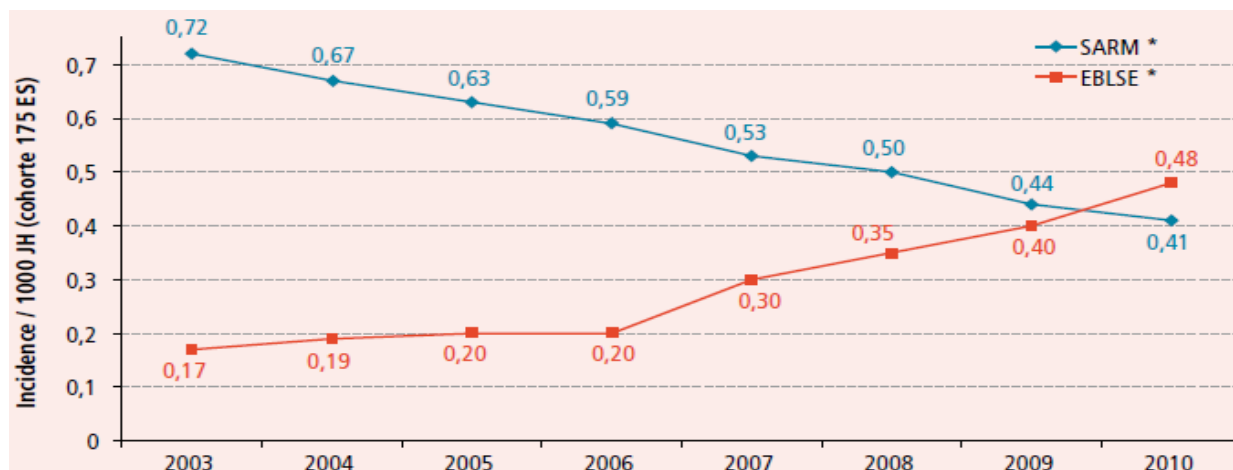


Figure 3. Densités d'incidence des SARM et des EBLSE entre 2003 et 2010 en France (d'après InVS).

Quant aux données relatives aux entérobactéries productrices des carbapénémases (EPC), elles montrent leur progression alarmante au niveau mondial avec une large diffusion des enzymes de type NDM dans le sous-continent indien, de type KPC dans le pourtour méditerranéen et dans le nord-est des Etats-Unis, et de type OXA-48 en Afrique du Nord (Lucet & Birgand 2011).

Le réseau EARSS-Net indique que certains pays européens ont d'ores et déjà des taux de prévalence de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes supérieurs à 1%. Des évolutions explosives ont été constatées dans certains pays du pourtour méditerranéen, où le taux des EPC est passé de moins de 1% en 2005 à plus de 15% en 2011 (Chypre, Italie), et atteint en Grèce 68,2% (EARSS-Net).

En France, le taux d'EPC reste inférieur à 1 % mais les bilans réalisés régulièrement par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) montrent une augmentation de cas rapportés passant de 2 signalements par an avant 2008 à 238 épisodes rapportés en 2012 (Figure 4). Les souches concernées étaient le plus souvent des *K. pneumoniae* sécrétrices de carbapénémases OXA-48 et KPC. Elles ont causé plusieurs épidémies, dont 56% à partir d'une souche importée de l'étranger.

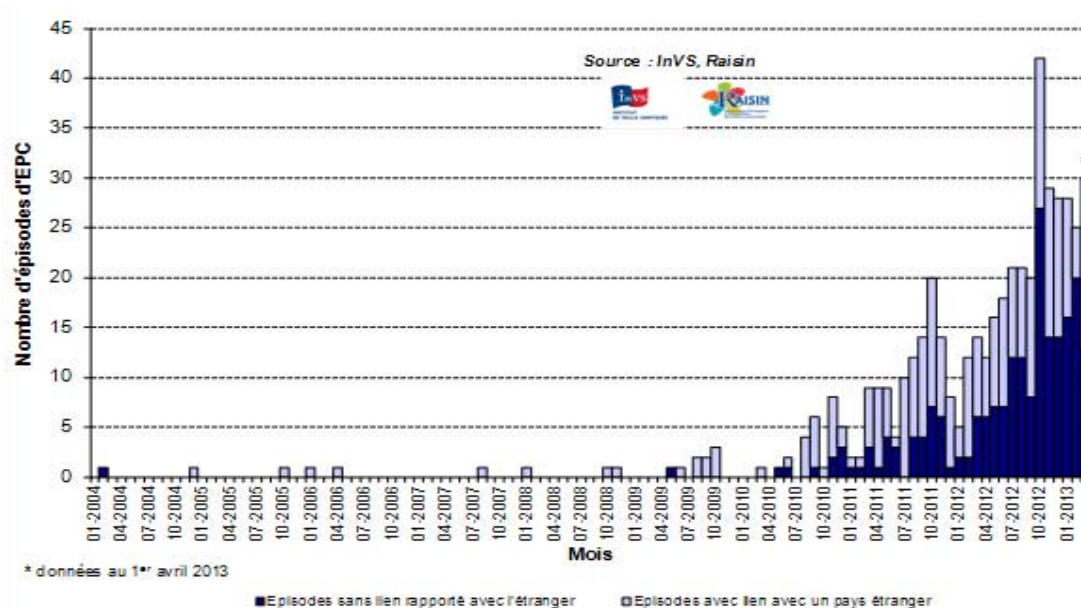


Figure 4. Nombre de signalements des EPC en France entre janvier 2004 et avril 2013 (d'après InVS).

L'ensemble de ces données montre que les entérobactéries multirésistantes constituent la menace infectieuse la plus sérieuse pour les prochaines années. Les mesures de prévention classiques visant à diminuer la transmission croisée et à réduire la pression de sélection par une utilisation raisonnée des antibiotiques sont insuffisantes face à cette nouvelle classe de BMR. Une meilleure compréhension des voies de leur dissémination est donc indispensable pour définir les stratégies de lutte contre ce phénomène.

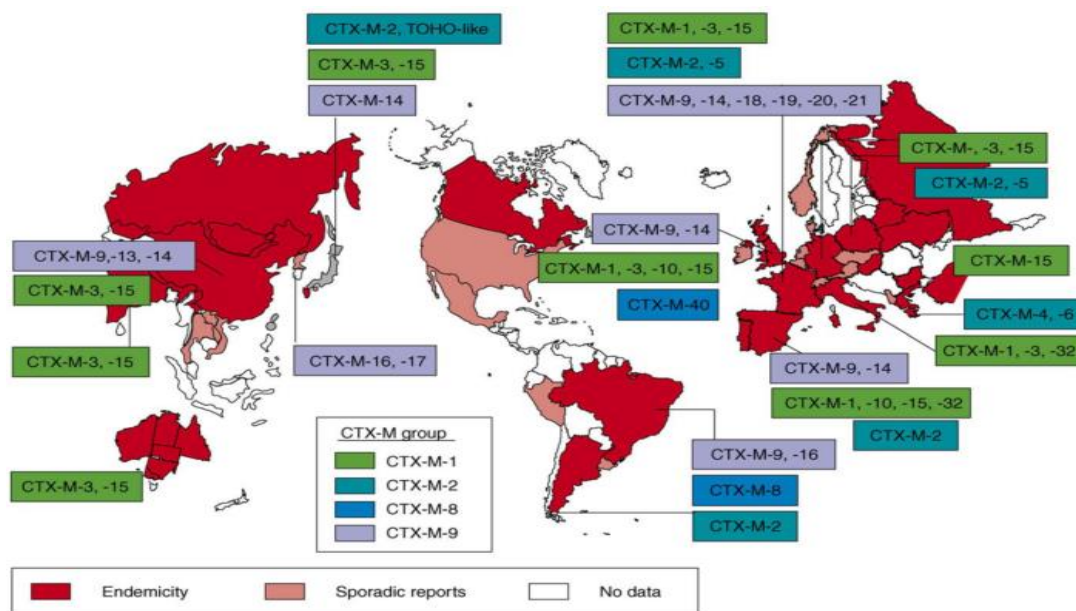
3. Emergence de *Escherichia coli* BLSE CTX-M : le « péril fécal »

a) Epidémiologie de BLSE CTX-M

Le succès épidémiologique de *E. coli* BLSE CTX-M peut être considéré comme le paradigme de l'émergence d'antibiorésistance.

La première description de BLSE CTX-M date de 1990 à Munich où une souche de *E. coli*, isolée du pus d'une otite moyenne chez un nourrisson, présentait une résistance au céfotaxime, tout en restant sensible au ceftazidime (Bauernfeind et al. 1990). L'enzyme provoquant ce phénotype de résistance a été nommée CTX-M-1 en référence à l'activité hydrolytique préférentielle de céfotaxime (CTX) et au lieu de description (M-Munich).

Durant les années 1990, une série de publications concernant ce type d'enzymes, nommées céfotaximases, a suivi : CTX-M-2 en Amérique du Sud, FEC-1 alias CTX-M-3 en Pologne, Toho 1 et 2 alias CTX-M-44 et CTX-M-45 au Japon (Cantón et al. 2012). Depuis ces premières communications, plus de 130 enzymes CTX-M ont été identifiées (Bush 2013). On constate actuellement une prédominance de certains types au niveau mondial, comme CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14 et CTX-M-15. D'autres CTX-M sont présentes de façon endémique : CTX-M-2 en Amérique du Sud ou CTX-M-1 en Italie (Cantón et al. 2012) (Figure 5).



Current Opinion in Microbiology

Figure 5. Répartition géographique des différents groupes de BLSE CTX-M (Cantón & Coque 2006).

L'apparition en même temps dans des pays très distants d'enzymes du même groupe (e.g. CTX-M-3 en Pologne, Taiwan et en France entre 1996 et 1999), associées toujours à des plasmides de caractéristiques similaires, suggère un rôle des déplacements internationaux dans la pandémie actuelle (Cantón et al. 2012). Même si cela ne peut être affirmé avec certitude pour ces BLSE, le rôle des voyages a bien été démontré, par exemple, pour la carbapénémase NDM-1 (Figure 6) (Kumarasamy et al. 2010; Laupland et al. 2008).

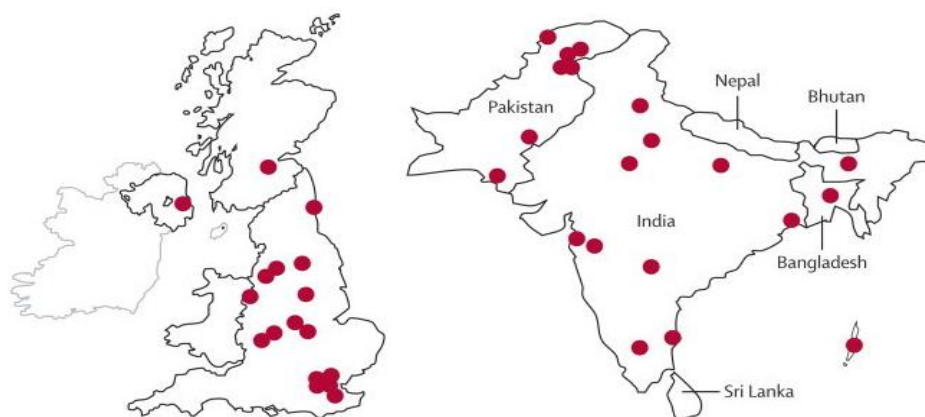


Figure 6. Dissémination internationale des EPC NDM-1 (Kumarasamy et al. 2010)

Après leur première description dans chacun des pays, on a observé une émergence rapide des souches de *E. coli* CTX-M, dont la prévalence a dépassé celle des souches de *K. pneumoniae* et *E. aerogenes* sécrétrices des BLSE TEM et SHV. Or, contrairement aux souches TEM et SHV, provoquant des épidémies nosocomiales, les *E. coli* CTX-M ont rapidement disséminé dans la communauté. Il est à présent clair que de nombreux cas de détection hospitalière de *E. coli* CTX-M ont été acquis dans la communauté et se sont révélés lors de l'hospitalisation sous pression antibiotique (Haut Conseil de Santé Publique 2010). En conséquence, l'identification des patients à risque de BLSE est impossible, contrairement aux autres BMR. Une mise en place de précautions complémentaires d'hygiène est donc difficilement envisageable pour *E. coli* CTX-M (SFHH 2009).

La dissémination au sein de la communauté ne se limite pas à la population humaine. Un nombre croissant d'études montre la présence d'entérobactéries BLSE CTX-M, chez les animaux, aussi bien domestiqués que sauvages (principalement *Salmonella enterica* et *E. coli*) (Haut Conseil de Santé Publique 2010; Wellington et al. 2013).

Des souches sécrétrices de BLSE CTX-M ont également été détectées dans des produits alimentaires d'origine animale (viande, œufs) et végétale (Cantón et al. 2012; Rolain 2013). Par exemple, des pousses de soja contaminées par *E. coli* CTX-M-15 ont été à l'origine de l'épidémie de syndrome hémolytique et urémique en Allemagne en 2011 (Weiser et al. 2013).

Plusieurs études montrent également la présence d'EBLSE dans l'environnement aquatique (Haut Conseil de Santé Publique 2010) :

- dans les effluents d'hôpitaux,
- dans les effluents de stations d'épuration,
- dans le réseau d'eau de consommation (Népal),
- dans des eaux de rivières et des sédiments de rivières (Lupo et al. 2012).

Enfin, la pratique d'épandage de fumier en agriculture a aussi contribué à la dissémination de CTX-M dans les sols (Wellington et al. 2013). Lors d'une étude récente, Hartmann et al. (2012) ont détecté la présence de gènes *bla*_{CTX-M} dans 5% d'échantillons de fèces bovins et 3 à 24% d'échantillons de sol de plusieurs fermes de Bourgogne (Figure 7).

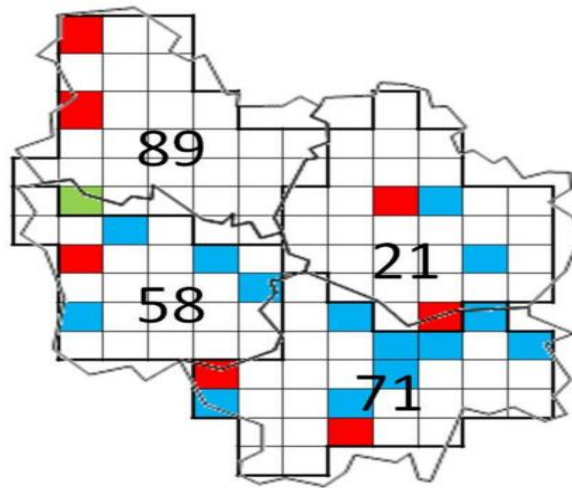


Figure 7. Détection de gènes *bla*_{CTX-M} dans les sols agricoles de Bourgogne (Hartmann et al. 2012).

E. coli CTX-M est donc actuellement pandémique. Il est ainsi urgent de comprendre quels ont été les moteurs de son émergence, puisque d'autres bactéries à Gram négatif multirésistantes pourraient emprunter un chemin similaire (Lucet & Birgand 2011).

b) Facteurs de l'émergence de *E. coli* BLSE CTX-M

Plusieurs facteurs ont contribué à la large dissémination des BLSE CTX-M (Figure 8).

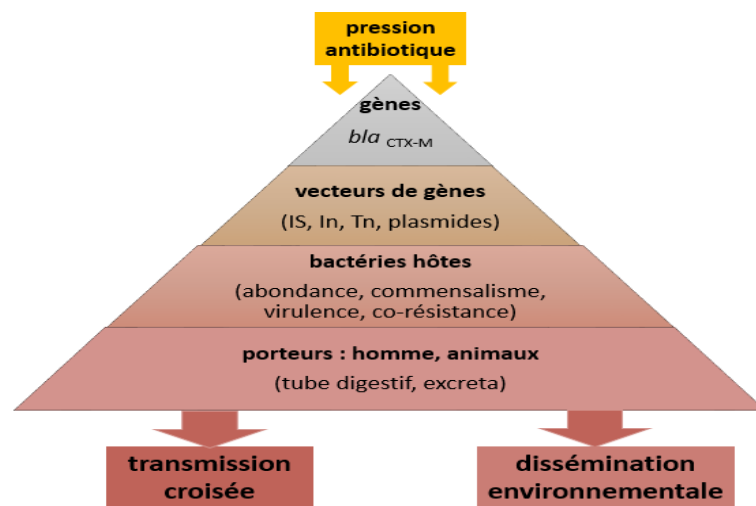


Figure 8. Facteurs favorisant l'émergence des BLSE CTX-M (modifié d'après Cantón et al. 2012).

Tout d'abord, des gènes *bla*_{CTX-M} sont associés à des supports génétiques mobiles particulièrement efficaces. Ils seront détaillés ultérieurement (Cantón et al. 2012).

La capacité des éléments génétiques mobiles à co-recruter d'autres gènes de résistance est un deuxième facteur du succès épidémiologique de CTX-M. Elle confère aux souches porteuses une

multirésistance qui facilite leur sélection par différentes classes d'antibiotiques. Dans le cas des gènes *bla*_{CTX-M}, leur association aux gènes de carbapénémases VIM, KPC et OXA-48 a déjà été décrite (un clone coproduisant CTX-M-15 et OXA-48 s'est même répandu en Europe) (Potron et al. 2011; Cantón et al. 2012). Des gènes de résistance aux fluoroquinolones *qnr* ainsi que *aac(6')-Ib-cr* conférant la résistance aux aminosides et certaines fluoroquinolones sont également souvent associés aux *bla*_{CTX-M} (Cantón & Coque 2006).

L'hébergement par des clones bactériens dits « à haut risque » est la troisième raison de la large diffusion des BLSE CTX-M. En effet, les *E. coli* BLSE CTX-M appartiennent souvent au clone ST131. Ce clone présente notamment de bonnes capacités d'adhésion lui permettant de persister dans le réservoir intestinal (Cantón et al. 2012).

Enfin, de manière plus générale, le caractère commensal de *E. coli* et sa forte concentration au sein du tube digestif des mammifères (10^8 par gramme de fèces), favorisent sa dissémination. Son excrétion quotidienne est en effet estimée à 10^{10} UFC dans les fèces et 10^8 UFC en cas d'infection urinaire. Au contraire, d'autres espèces d'entérobactéries (e.g. *K. pneumoniae*) ne sont pas toujours présentes au sein de la flore intestinale et leur densité ne dépasse pas 10^4 UFC par gramme de fèces. Ceci explique en partie pourquoi *E. coli* CTX-M a pu devancer les espèces nosocomiales épidémiques classiques (e.g.. *Klebsiella* BLSE) qui prédominaient dans les années 1990.

Cette forte concentration de *E. coli* BLSE au sein du tube digestif lui vaut le terme du « nouveau péril fécal » du XXI^{ème} siècle.

Jusqu'à présent négligée dans les programmes des autorités d'hygiène, il est clair désormais que la gestion du problème des entérobactéries multi-résistantes ne peut se concevoir sans la gestion des excréta. Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre le rôle du tube digestif dans l'émergence et la dissémination de gènes de résistance pour établir des stratégies efficaces visant à enrayer ce phénomène.

B. Intestin : réservoir de gènes de résistance

1. Réservoir intrinsèque

De par son importante densité (150 fois plus de gènes que le génome humain) (Gill et al. 2006), le microbiome intestinal (i.e. ensemble des gènes de la microflore intestinale) peut représenter un réservoir de gènes de résistance aux antimicrobiens (ou résistome) (Sommer & Dantas 2011).

Pendant longtemps, la prévalence de l'antibiorésistance dans ce réservoir était majoritairement étudiée par des approches basées sur la culture, plus rarement sur l'amplification génique. Ces premières méthodes ont montré, par exemple, que les souches commensales de *E. coli* d'adultes sains représentaient un réservoir de gènes de résistance au triméthoprim (dfrA), sulphaméthoxazole (*sul*), tétracycline (*tet*) et ampicilline (*bla*_{TEM}) (Bailey et al. 2010).

Cependant, ces deux approches sont insuffisantes puisque :

- la majorité des bactéries du microbiote intestinal (70-80%) reste non cultivable (Doré & Corthier 2010),
- la détection par PCR cible seulement les gènes de résistance connus (Schmieder & Edwards 2012).

Le développement récent de techniques de métagénomique a permis d'explorer le résistome intestinal de façon plus représentative (Schmieder & Edwards 2012). Une approche de métagénomique fonctionnelle (Figure 9) appliquée aux microbiotes intestinaux et salivaires de deux adultes sains a notamment permis de détecter 95 nouveaux gènes de résistance potentiellement exprimables, prouvant ainsi que l'abondance et la diversité du résistome intestinal intrinsèque humain étaient jusqu'alors largement sous-estimées (Sommer et al., 2009).

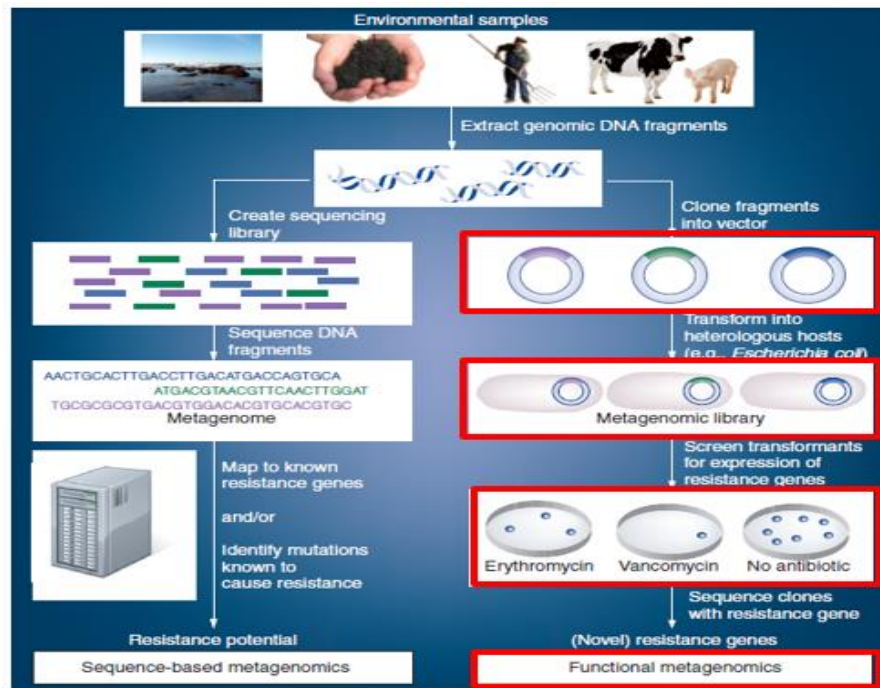


Figure 9. Analyse métagénomique de l'antibiorésistance dans les communautés microbiennes (Schmieder & Edwards, 2012).

2. Réservoir extrinsèque

Les bactéries ingérées avec l'alimentation et colonisant transitoirement l'intestin peuvent contribuer au pool flexible des gènes de résistance du microbiote indigène. Plusieurs exemples peuvent ainsi être cités :

- en Europe, dans les années 1990, le gène de résistance à la vancomycine, *vanA*, a été détecté chez les animaux d'élevage chez lesquels l'avoparcine (un analogue de la vancomycine) a été utilisée comme facteur de croissance (Klare et al. 1995). Les entérocoques *vanA* ont depuis émergé en clinique en tant que BMR prioritaires (SFHH 2009).
- il est reconnu que des *E. coli* multirésistants (notamment CTX-M) provenant de l'alimentation sont responsables d'infections urinaires. Ce phénomène est baptisé « *foodborne urinary tract infections* » (FUTI) (Nordstrom et al. 2013).
- le résistome animal étant mieux apprécié par des études métagénomiques, la présence de nombreux gènes de résistance chez les animaux de rente ou sauvages a été constatée (Rolain 2013). Zhu et al. (2013) ont, par exemple, dénombré 149 gènes de résistance chez les porcs issus d'un élevage intensif en Chine.
- l'antibiorésistance est aussi largement représentée dans les piscicultures et sa transmission vers les pathogènes humains a été montrée (Heuer et al. 2009).
- les légumes peuvent également être souillés par des bactéries multirésistantes, comme *Pseudomonas teessidea*, portant le gène *bla*_{CTX-M-15}, qui a été détecté sur des feuilles d'épinards destinées à la consommation. De plus, des nouveaux gènes de BLSE, les *bla*_{RHAN-2}, ont été constatés chez *Rhanella aquatilis*, espèce saprophyte retrouvée habituellement sur des légumes crus (Rolain 2013).
- beaucoup d'études ont été consacrées aux probiotiques, *Lactobacilli* et *Bifidobacteria*, en tant que sources de gènes de résistance (Ammor et al. 2008)

De plus, les gènes de résistance du réservoir digestif peuvent être disséminés via les déjections humaines et animales, enrichissant ainsi le réservoir environnemental par le biais des stations d'épuration et du fumier (Wellington et al. 2013).

Le résistome digestif établit donc de nombreuses interconnexions avec les différents réservoirs environnementaux (Figure 10) (Marshall et al., 2009; Schmieder & Edwards 2012). Depuis 2008, l'APUA (Alliance for the Purdent Use of Antibiotics), une organisation non-gouvernementale américaine, développe une approche multidisciplinaire pour étudier l'ensemble de ce réseau complexe d'antibiorésistance. Elle a notamment lancé le projet ROAR (Reservoirs of Antibiotic Resistance Project) qui tente de déterminer la prévalence et la dissémination de gènes de résistance dans les réservoirs commensaux et environnementaux (Marshall et al. 2009).

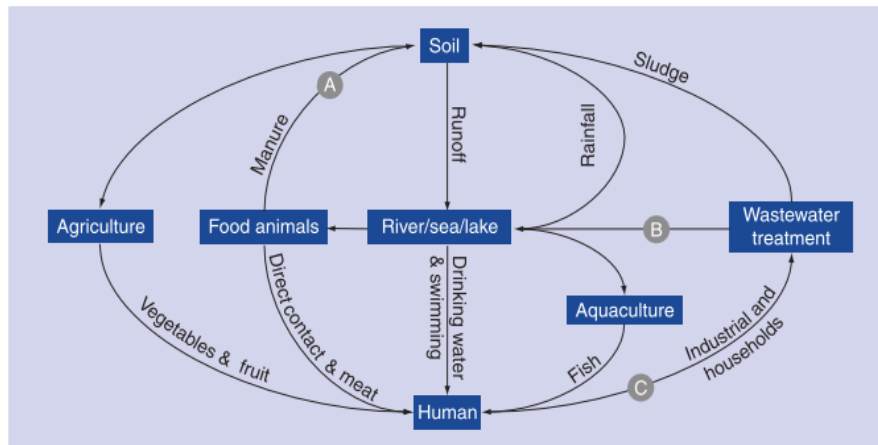


Figure 10. Voies de dissémination des gènes d'antibiorésistance (Schmieder & Edwards 2012).

L'implication du microbiote intestinal dans l'émergence de l'antibiorésistance et sa dissémination est de plus en plus évidente. Cependant, les acteurs et les mécanismes mis en jeu dans les transferts de gènes sont encore peu étudiés.

C. Transfert horizontal de gènes dans le tractus gastro-intestinal

Parce qu'il combine une grande densité bactérienne, un flux continu de nutriments, et qu'il est parfois exposé à de fortes pressions sélectives en antibiotiques, l'environnement intestinal peut être propice aux transferts de gènes (Aminov 2011; Kelly et al., 2009).

1. Vecteurs et mécanismes impliqués dans le transfert de gènes

a) Définitions

La dissémination de résistances aux antibiotiques entre bactéries est favorisée par des supports génétiques regroupés sous la dénomination d'« éléments génétiques mobiles » (EGM). Cette dissémination est associée à des phénomènes de transfert de gènes horizontaux entre bactéries (TGH) qui se regroupent en trois types : la transformation, la transduction et la conjugaison (Figure 11).

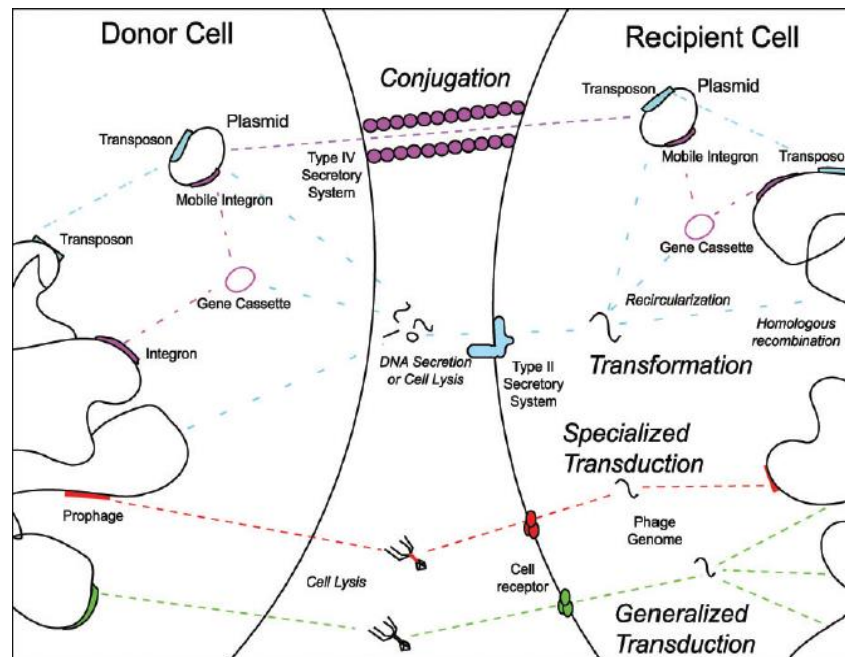


Figure 11. Mécanismes impliqués dans les transferts horizontaux de gènes (d'après Zaneveld et al. 2008).

La transformation correspond à l'incorporation d'un ADN extracellulaire libre acquis par la bactérie dans son environnement proche. Ces ADN extracellulaires sont soit libérés par la lyse de cellules mortes ou de particules virales, soit excrétés par des cellules viables. Pour que la transformation naturelle survienne, la bactérie doit développer un état physiologique de « compétence », en réponse à des stimuli environnementaux particuliers (Thomas & Nielsen 2005).

La transduction correspond au transfert de matériel génétique, d'une bactérie à une autre, par l'intermédiaire de bactériophages, qui sont des virus infectant spécifiquement les bactéries. Des erreurs d'empaquetage survenant au cours du développement phagique, peuvent ainsi conduire à la formation de particules virales contenant des morceaux de génome bactérien. Ces segments d'ADN pourront être injectés dans une nouvelle bactérie lors d'une infection ultérieure, où ils pourront se maintenir s'ils sont intégrés au génome de l'hôte (Frost et al., 2005).

La conjugaison, quant à elle, est un mécanisme de transfert d'ADN qui fait intervenir un contact intime entre deux partenaires. De l'ADN est transféré d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse à travers un pore de conjugaison. La conjugaison est considérée comme le mécanisme de transfert de gènes le plus important et le plus efficace (Sota & Top 2008). Différents éléments peuvent être transférés par conjugaison : des plasmides, des éléments de type ICE (*integrative and conjugative elements*) mais aussi des régions de chromosomes bactériens (Guglielmini et al. 2011; Frost et al. 2005). La conjugaison implique deux machineries protéiques, l'une permettant d'établir le contact entre deux partenaires l'autre permettant de transférer un brin d'ADN vers la bactérie receveuse. A l'issue de la conjugaison, une copie de l'élément transféré subsiste dans la bactérie donneuse tandis qu'une copie est acquise par la bactérie receveuse. La conjugaison correspond donc à une mode particulier de réplication intercellulaire (Thomas & Nielsen 2005).

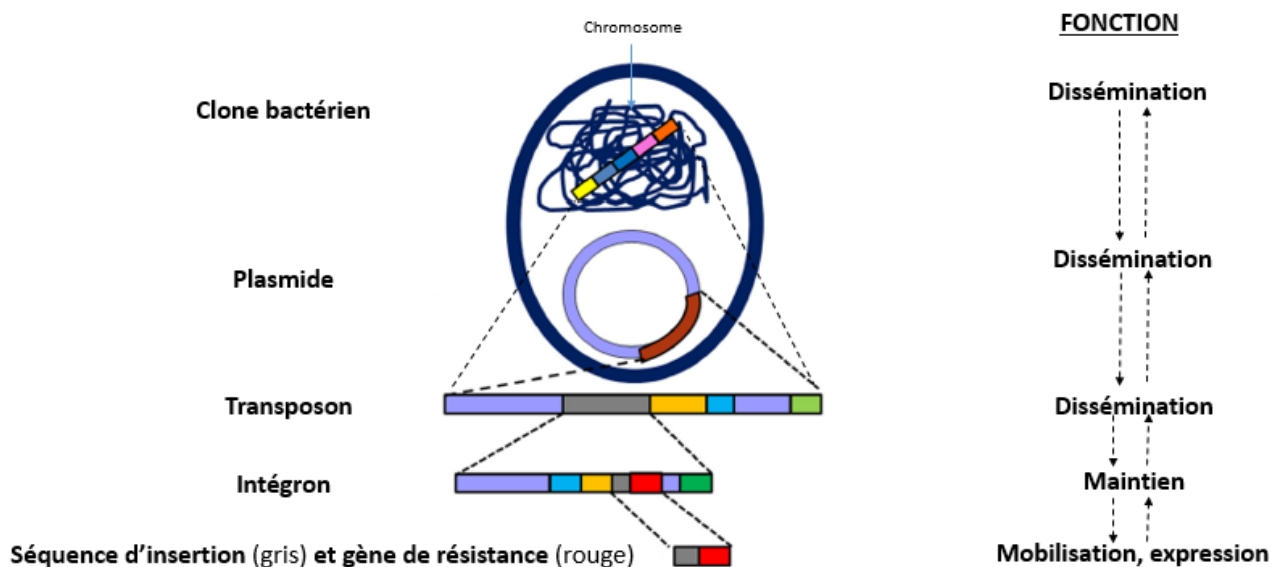


Figure 12. Représentation hiérarchique des éléments génétiques mobiles (modifié d'après Cantón et al. 2012).

Plusieurs éléments peuvent participer à la capture, au maintien et à la dissémination des gènes de résistance (Figure12) :

- les séquences d'insertion et les transposons sont des séquences d'ADN capables de promouvoir leur propre transfert d'un chromosome ou plasmide à un autre. Les séquences d'insertion (IS de l'anglais *insertion sequence*) sont constituées d'un gène de transposase, encadré par des séquences de nucléotides inversement répétés (IR – *inverted repeats*). Les transposons sont constitués de deux IS encadrant un ou plusieurs gènes, notamment des gènes de résistance. La transposase reconnaît les IR aux extrémités du transposon, ce qui lui permet de l'exciser de son site initial. Elle l'insère ensuite dans un site cible à un autre endroit du génome, qui contient une séquence directement répétée (DR – *direct repeats*) (Figure 13).

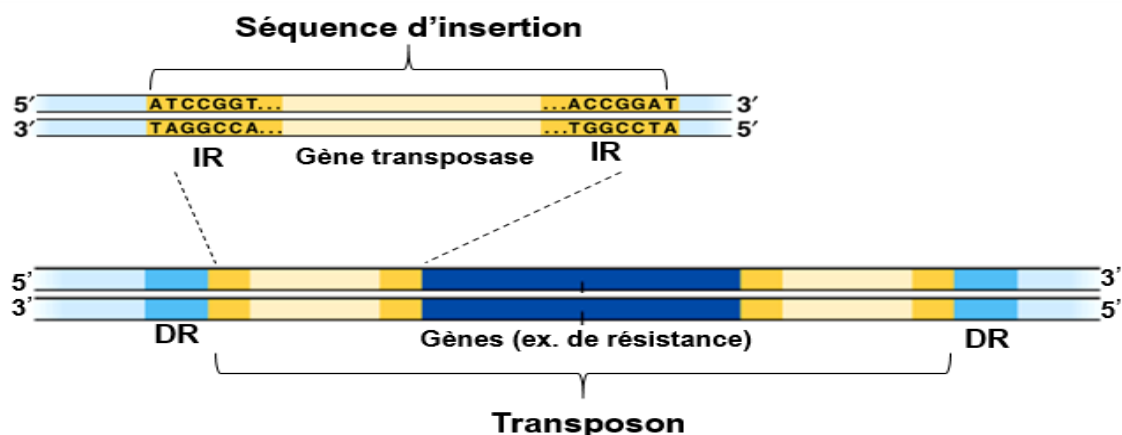


Figure 13. Structure d'une séquence d'insertion et d'un transposon. (IR – *inverted repeats*, DR – *direct repeats* ; modifié d'après www.zo.utexas.edu/sjasper/images/18.18.gif).

- les intégrons peuvent contenir un ou plusieurs gènes de résistance sous forme de cassettes. Les intégrons sont définis comme des plateformes fonctionnelles composées de trois éléments clefs : un gène d'intégrase *intI*, un site spécifique de recombinaison *att* et un

promoteur *Pc* (Figure 14). Ainsi, les cassettes de gènes peuvent être facilement intégrées et déplacées au sein d'un intégron par un mécanisme de recombinaison, site spécifique catalysé par l'intégrase. Le promoteur va ensuite stimuler l'expression du gène déplacé dans sa proximité. L'intégron, lui-même, est un élément immobile porté par des transposons ou des plasmides, plus rarement par des chromosomes bactériens.

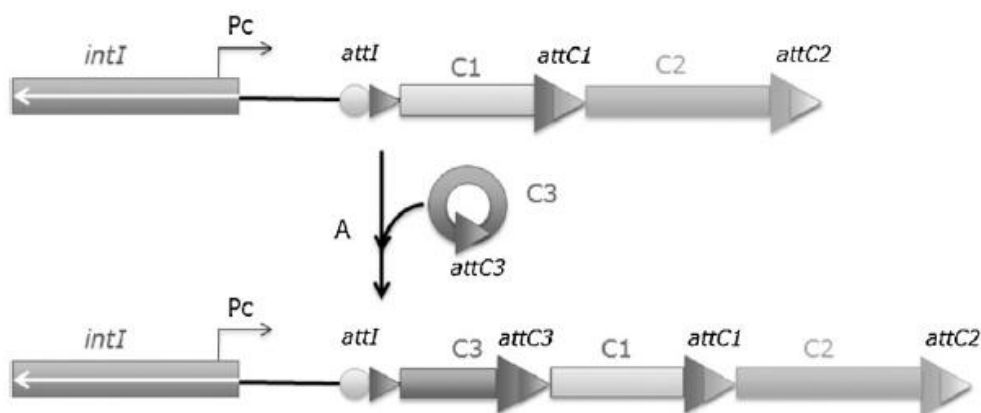


Figure 14. Structure d'un intégron et mécanisme de recombinaison de cassettes.

L'intégrase codée par le gène *intI* assure l'excision et l'insertion des cassettes (e.g. C3), par recombinaison entre les sites *att* (ici *attI* et *attC3*). *Pc* – promoteur de cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2* – sites spécifiques de recombinaison ; C1, C2, C3 – cassettes de gènes (d'après Barraud & Ploy 2013).

- les plasmides peuvent se définir comme des entités d'ADN circulaire, parfois linéaire, capables de se répliquer indépendamment du chromosome. Les plasmides conjugatifs peuvent se transférer vers d'autres cellules bactériennes. Les espèces bactériennes acceptant le transfert définissent le spectre d'hôtes du plasmide qui peut être plus ou moins large. La cellule bactérienne peut contenir plusieurs types de plasmides, à condition que leur présence ne s'exclue pas mutuellement par la compétition pour une étape de transfert conjugatif. Cette exclusion mutuelle, nommée incompatibilité, a permis la classification des plasmides en « groupes d'incompatibilité » (Toussaint & Merlin 2002; Thomas & Nielsen 2005).
- les ICE (pour *Integrative and Conjugative Elements* ou transposons conjugatifs) se transfèrent également par conjugaison, mais ne se répliquent pas de manière autonome. Ils doivent s'intégrer au génome de l'hôte par un mécanisme de recombinaison « site spécifique » pour pouvoir être maintenus (Toussaint & Merlin 2002).

Tous ces éléments participent ensemble à la variabilité génétique des procaryotes en agissant comme une source de recombinaison, permettant une fixation plus rapide de nouveaux gènes. Ces gènes peuvent coder des traits avantageux, permettant une adaptation aux pressions sélectives locales, comme la résistance aux antibiotiques ou la capacité d'utiliser de nouvelles sources de carbone (Jones 2010).

b) EGM et la dissémination de BLSE CTX-M

L'exemple des BLSE CTX-M illustre l'activité des EGM. En effet, les gènes chromosomiques *bla_{KLU}* de *Kluyvera* spp., dont dérivent les *bla_{CTX-M}*, sont entourés de séquences d'insertion (IS) servant à leur mobilisation (Canton 2012). Il a été démontré que les événements de mobilisation des gènes *bla_{CTX-M}* ont été dix fois plus fréquents que ceux des autres gènes de bêta-lactamases de classe A (Barlow et al. 2008). Une fois mobilisés, ces gènes se sont retrouvés dans les intégrons, eux-mêmes situés au sein des transposons, véhiculés ensuite par des plasmides conjugatifs (Figure 12). En effet, le gène pandémique, *bla_{CTX-M}*, est souvent porté par des plasmides FII dont le spectre d'hôtes comprend l'ensemble des entérobactéries. Les transferts de ces

plasmides, particulièrement adaptés à ce groupe, sont fréquents. Leur persistance dans les receveuses est également facilitée. Ainsi, on a rapidement vu émerger les enzymes CTX-M, initialement décrites chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Salmonella* spp., dans d'autres espèces d'entérobactéries. De plus, d'autres plasmides, présentant un plus large spectre d'hôtes (IncN, IncL/M) ont participé à une dissémination des CTX-M vers des bacilles à Gram négatif non fermentants, comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. et *Stenotrophomonas maltophilia* (Cantón et al. 2012).

c) EGM dans le microbiome intestinal

Des études métagénomiques ont montré que le microbiome intestinal héberge de nombreux EGM (plasmides, transposons, intégrons et phages) (Ogilvie et al., 2012; Jones 2010). Les éléments les mieux caractérisés, à ce jour, proviennent surtout des espèces bactériennes cultivables. Celles-ci ne constituent pourtant qu'une portion très minoritaire de la flore intestinale. A ce titre, notre vision de la diversité des EGM dans le microbiote est probablement fortement biaisée (Ogilvie et al., 2012).

Le rôle de ce pool flexible de gènes dans le développement et le fonctionnement du microbiote intestinal reste peu exploré. Sa participation dans la dissémination des gènes de résistance est mieux documentée. Le Tableau 1 regroupe quelques exemples d'EGM porteurs de gènes de résistance aux différentes classes d'antibiotiques.

Tableau 1. EGM porteurs de gènes d'antibiorésistance chez des bactéries intestinales.

Elément génétique mobile	Espèce bactérienne	Gènes/phénotypes de résistance	Référence
Enterobacteriaceae			
pMG252	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	aminosides, quinolones, céphalosporines, sulfamides	Martínez-Martínez et al. 1998
pK245	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>qnrS</i> , <i>aac</i> , <i>str</i> , <i>cat</i> , <i>sul</i> , <i>tetD</i> , <i>dfr</i>	Chen et al. 2006
pNDM-HK	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>aac</i> , <i>arm</i> , <i>sul</i> , <i>mph</i> , <i>mel</i>	Ho et al. 2011
Anaérobies stricts			
Tc ^R Em ^R DOT (ICE)	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>tet Q</i>	Salyers & Shoemaker 1995
CTnDOT (ICE)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>tetQ</i> , <i>ermF</i>	Valentine et al. 1988
pIP417	<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>nimA</i>	Breuil et al. 1989
pIP421	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>nimD</i>	Trinh et al. 1995
Bactéries à Gram +			
pIP816	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>vanA</i>	Sletvold et al. 2010
Tn916 (ICE)	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>tetM</i>	Clewell et al. 1995
pIP501	<i>Streptococcus agalactiae</i>	MLS ^R , cat ^R	Thompson & Collins 2003
pK214	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>tet</i>	Perreten et al. 1997

Gènes de résistance : *qnr* (quinolones), *tet* (tétracycline), *erm* (érythromycine), *nim* (metronidazole), *van* (glycopeptides), *aac* et *arm* (aminoglycosides), *str* (streptomycine), *cat* (chloramphénicol), *sul* (sulfamides), *dfr* (triméthoprime), *bla* (bêta-lactamines), *mph* et *mel* (macrolides). MLS^R -résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines, cat^R -résistance au chloramphénicol, mult-R - résistances multiples.

Ainsi, des relations ont pu être établies entre la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques et des éléments mobiles du microbiote intestinal. Outre les plasmides d'*Enterobacteriaceae* vecteurs de gènes de BLSE et de carbapénémases (Ho et al., 2011; Wu et al., 2010), on retiendra par exemple l'isolement d'entérocoques porteurs de plasmides véhiculant des gènes de résistance aux glycopeptides (*van*) (Arias & Murray 2012). Des plasmides conjugatifs et ICE (e.g. CTnDOTs) porteurs de plusieurs gènes de résistance (*tet*, *erm*, *nim*) ont aussi été décrits chez les espèces du genre *Bacteroides* qui prédominent dans le microbiote colique (Salyers & Shoemaker 1995; Trinh et al., 1996; Breuil et al., 1989; Valentine et al., 1988).

2. Facteurs influençant le transfert de gènes

Des nombreux facteurs présents au sein du microbiote vont pouvoir influencer l'efficacité de la dissémination des EGM.

a) Facteurs bactériens

Parmi les facteurs liés aux bactéries, la nature même de l'élément mobile va impacter le type, l'efficacité et la fréquence des transferts. Voici quelques exemples :

- la nature du pilus codé par un EGM conjugatif peut influencer son spectre d'hôtes. En effet, il existe une spécificité du pilus pour les lipopolisaccharides et les protéines de la membrane externe de la cellule receveuse (Licht & Wilcks 2005). Les pili codés par les plasmides de la famille IncP ont une faible spécificité de la surface, expliquant notamment que les plasmides les possédant puissent être retrouvés à la fois chez des bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Samuels et al. 2000).
- les propriétés du pilus de conjugaison influencent aussi l'efficacité des transferts. Ainsi, des pili rigides, plus fragiles, sont plus efficaces pour les transferts de plasmides sur des surfaces solides, tandis que les pili flexibles permettent des conjugaisons dans des milieux liquides et sur des supports solides (Bradley et al., 1980).
- la nature de l'appareil réplcatif codé par les plasmides est aussi importante. Sa compatibilité avec les systèmes réplcatifs de la cellule hôte est indispensable pour la réplcation et donc la maintenance du plasmide dans les descendants de la cellule (Thomas & Nielsen 2005).
- les espèces des bactéries donneuses et receveuses en présence ainsi que leur état physiologique vont également jouer un rôle sur le spectre d'hôtes, le taux et l'efficacité des transferts (Licht & Wilcks 2005).

b) Facteurs intestinaux

Hormis les facteurs bactériens, divers facteurs environnementaux vont jouer sur les TGH : la température, le pH, la disponibilité des substrats carbonés, l'organisation du milieu, la densité et la diversité de la population bactérienne (Frost & Koraimann 2010). Selon certains auteurs, le milieu intestinal offre une combinaison de conditions favorables aux transferts de gènes (Aminov 2011).

Au sein du microbiote, l'afflux continu de nutriments permet aux bactéries de maintenir leurs métabolismes. En effet, il a été démontré *in vitro* que la carence en nutriments limitait les transferts de certains plasmides (Fox et al., 2008).

En outre, on peut supposer que la densité bactérienne intestinale est telle qu'elle favorise les contacts intercellulaires nécessaires notamment pour la conjugaison.

Par ailleurs, il est possible de retrouver des antibiotiques au niveau de l'intestin. Ceux-ci peuvent impacter les phénomènes de transfert, en raison de la pression sélective qu'ils exercent mais aussi pour leurs possibles effets stimulateurs. Les travaux de Doucet-Populaire et al. (1991) ont, par exemple, montré que l'administration dans l'eau de concentrations subinhibitrices de tétracycline à des souris gnotobiotiques décuplait le transfert du transposon Tn1545 d'une souche d'*Enterococcus faecalis* vers une souche de *Listeria monocytogenes*. Lartigue et al. (2006) ont constaté que la mobilisation de la séquence d'insertion ISEcp1 associée au gène *bla*_{CTX-M} était

augmentée par des facteurs de stress tels que les antibiotiques ou la température (40°C). Les auteurs suggèrent que la température du tube digestif, en favorisant la mobilisation de gènes CTX-M, pourrait contribuer à l'extraordinaire dissémination de ces enzymes.

c) Réponse SOS et transfert de gènes

Beaber et al., (2004) ont élucidé certains mécanismes moléculaires favorisant le transfert de gènes.

Ces mécanismes font notamment appel à la réponse SOS des microorganismes. Elle est déclenchée lors des agressions causant la fragmentation de l'ADN génomique bactérien. Les gènes de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont regroupés au sein d'un système appelée « régulon SOS ». En l'absence de stress, l'expression de ce régulon est constamment freinée par un répresseur. Or, les fragments d'ADN simple brin, apparaissant lors d'une agression, activent la protéine RecA, enzyme clivant le répresseur du « régulon SOS » (Figure 15).

D'autres gènes que ceux impliqués dans la réparation de l'ADN peuvent être dérégulés lors de la réponse SOS. Ainsi, pour l'ICE SXT, la réponse SOS lève la répression des gènes de conjugaison (notamment *tra*) et augmente plus de 300 fois le taux de son transfert (Beaber et al., 2004).

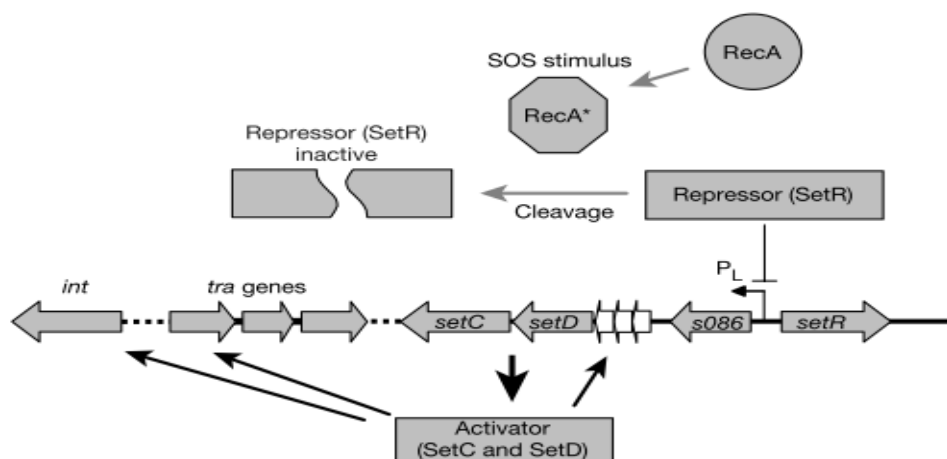


Figure 15. Réponse SOS et transfert de gènes de shigatoxine (SXT)
(Baeber et al. 2004).

De nombreux autres facteurs présents dans l'intestin peuvent déclencher la réponse SOS de façon directe ou indirecte : des variations de pH, des médiateurs bactériens impliqués dans le *quorum sensing* ou, potentiellement, des hormones de l'hôte (Hughes et al. 2009; Clarke et al. 2006; Radwan et al. 2009).

Une expérience *in vitro* a en effet montré que des concentrations physiologiques de noradrénaline augmentaient le transfert horizontal d'un plasmide conjugatif d'une souche clinique de *Salmonella enterica* vers une souche de *E. coli*. L'expression de gènes *tra* est ici aussi augmentée (Peterson et al., 2011). Le mécanisme exact et son lien avec la réponse SOS ne sont pourtant pas encore bien connus. Cette observation suggère toutefois, que le stress de l'hôte pourrait également impacter le type et la fréquence des transferts génétiques dans l'intestin par l'intermédiaire des catécholamines déversées dans sa lumière.

3. Exemples de transferts horizontaux de gènes *in vivo*

L'implication du microbiote intestinal en tant que réservoir et source de dissémination des plasmides de résistance est de mieux en mieux documentée.

a) Preuves indirectes

Des exemples indirects des TGH survenus *in vivo* sont fournis par l'observation de profils plasmidiques identiques provenant des différents isolats cliniques, comme le plasmide pKpQUIL retrouvé dans une souche de *Klebsiella pneumoniae* et une souche de *E. coli*, isolées chez un même patient (Goren et al., 2010).

Le fait que l'on retrouve des gènes identiques, partagés par des espèces bactériennes intestinales appartenant à des phyla différents, suggère également, que des transferts horizontaux peuvent avoir lieu, même entre des espèces phylogénétiquement éloignées (Figure 16) (Salyers et al., 2004; Alauzet 2009).

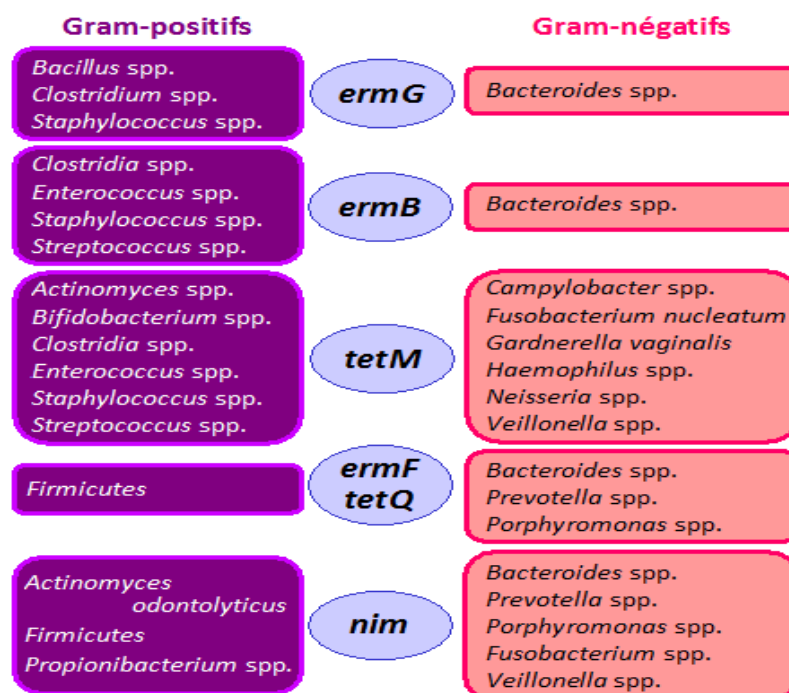


Figure 16. Gènes de résistance communs aux bactéries à Gram négatif et à Gram positif (d'après Salyers et al. 2004 et Alauzet 2009).

b) Exemples de conjugaison bactérienne *in vivo*

Parmi les principaux mécanismes de transfert connus, la conjugaison est celui qui a été le mieux exploré et démontré. Le transfert conjugatif de plasmides et d'autres EGM a été montré *in vivo* dans l'intestin de différents modèles mammifères et aviaires, avec des échanges survenant entre des espèces proches ou plus éloignées de bactéries appartenant à tous les phyla majeurs (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*) (Licht & Wilcks 2005; Ogilvie et al., 2012). L'espèce la plus utilisée en tant que donneuse est *E. coli*, mais plusieurs autres espèces Gram-négatives et Gram-positives ont été testées (Tableaux 2 et 3).

Par exemple, la transmission des transposons Tn916 et Tn1545, porteurs de gènes de résistance à la tétracycline (*tetM*) ou à l'érythromycine (*ermB*), a été décrite à partir d'une souche de *E. faecalis* vers d'autres *E. faecalis* et vers *L. monocytogenes* (Bahl et al., 2004; Doucet-Populaire et al., 1991). Les *Lactobacillus* spp., largement utilisés dans le secteur agroalimentaire, notamment en tant que probiotiques, pourraient aussi être à l'origine de TGH de gènes de résistance (Feld et al., 2008; Tuohy et al., 2002). De même, le transfert de pLFE1, porteur de résistances aux macrolides, lincosamides et streptogramines, de *Lactobacillus plantarum* vers *E. faecalis* a été rapportés dans l'intestin de la souris (Feld et al. 2008).

Tableau 2. Exemples d'études de transferts d'EGM *in vivo* à partir des bactéries à Gram négatif.

Donneuse	Receveuse	Élément génétique mobile	Environnement intestinal	Référence
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	R1drd19, RP4	souris STR	Licht <i>et al.</i> , 1999, 2003
		R388	souris axéniques et HFA	Duval-Iflah <i>et al.</i> , 1994, 1996
		R64, R64drd-11	poussins axéniques	Sensonetti <i>et al.</i> , 1980
		pKJK5	rats axéniques	Bahl <i>et al.</i> , 2007
		Hly	porcs	Klimuszko <i>et al.</i> , 1989
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	plasmide tetO	poussins	Avrain <i>et al.</i> , 2004
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>E. coli</i>	pYD1	souris axéniques et HFA	Duval-Iflah <i>et al.</i> , 1980
<i>Salmonella enterica</i> serovar Virchow	Enterobacteriaceae	Plasmide blaCTX-M	rats HFA	Faure <i>et al.</i> , 2010
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	<i>E. coli</i>	p2	souris	Stecher <i>et al.</i> , 2012
<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	5 plasmides	souris STRP	Schjorring <i>et al.</i> , 2008

Tableau 3. Exemples d'études de transferts d'EGM *in vivo* à partir des bactéries à Gram positif.

Donneuse	Receveuse	Élément génétique mobile ou gène	Environnement intestinal	Référence
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	pAM717, pAM771	hamster	Huycke <i>et al.</i> 1992
		pCF10	cochon miniature	Licht <i>et al.</i> 2002
		Tn 916	rats axéniques	Bahl <i>et al.</i> 2004
	<i>L. monocytogenes</i>	Tn 1545	souris axéniques	Doucet-Populaire <i>et al.</i> 1991
	<i>E. coli</i>	pAT191	souris axéniques	Doucet-Populaire <i>et al.</i> 1992
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	pCAL 1, pCAL2	souris	Lester <i>et al.</i> 2004
		vanA	homme	Lester <i>et al.</i> 2006
		Tn 1546 (vanA, tetL, ermB)	souris axéniques	Moubareck <i>et al.</i> 2003
		vanA, vanB	souris axéniques	Dahl <i>et al.</i> 2007
	<i>E. faecium</i>	vanA	souris	Mater <i>et al.</i> 2005
	<i>E. faecalis</i>	vanA	souris axéniques	Mater <i>et al.</i> 2008
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	pAMβ1	souris axéniques	Morelli <i>et al.</i> 1988
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. lactis</i>	pAMβ1, pCK1 (plasmide recombinant)	rats HFA	Tuohy <i>et al.</i> 2002
	<i>E. faecalis</i>	pAMβ	souris	Igimi <i>et al.</i> 1996
		pIL205 + mobilisation des plasmides mob	souris axéniques	Gruzza <i>et al.</i> 1993
		Tn916-like	rats axéniques	Boguslawska <i>et al.</i> 2009
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>E. faecalis</i>	pLFE1 (ermB)	rats axéniques, souris STR	Feld <i>et al.</i> 2008
		Plasmides tetM, ermB	rats axéniques	Jacobsen <i>et al.</i> 2006
<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	Tn1549like (vanB2)	souris axéniques	Launay <i>et al.</i> 2006

STR – modèle murin avec microbiote natif traité par streptomycine; HFA – *human flora associated* (modèle murin gnotobiotique hébergeant une flore intestinale d'origine humaine présélectionnée *in vitro*).

c) Exemples de transformation *in vivo*

Des événements de TGH par transformation ont été recherchés dans le tube digestif, notamment dans le cadre des risques liés à la consommation de produits provenant d'organismes génétiquement modifiés (OGM). Ils n'ont pas été détectés pour le moment (Licht & Wilcks 2005). Ceci peut être lié à une trop faible sensibilité des techniques actuelles pour détecter des événements de transfert rares. Une autre raison peut être la stratégie des études, notamment du moment d'échantillonnage après l'introduction de l'OGM dans le milieu intestinal (Nielsen & Townsend 2004).

d) Exemples de transduction *in vivo*

Il existe également peu de données concernant la transduction au sein du microbiote intestinal (Licht & Wilcks 2005). Il a été toutefois démontré que le phage CTX Φ codant pour la toxine cholérique pouvait être transmis efficacement à *Vibrio cholerae* dans l'intestin murin. Cette transduction était même plus efficace dans le milieu intestinal qu'*in vitro* (Licht & Wilcks 2005). Il en était de même pour la transduction du gène de la shiga-toxine (*stx1*) porté par un phage lysogène H-19B, vers *E. coli* dans le tractus digestif de la souris (Licht & Wilcks 2005).

Les flux génétiques semblent donc être importants entre les populations bactériennes intestinales. Le paragraphe suivant fait un état des lieux des principales approches utilisées pour explorer ces TGH *in situ*.

D. Méthodes d'étude de transfert horizontaux de gènes

Il existe plusieurs approches pour étudier le transfert de gènes : une approche indirecte, basée sur des évidences rétrospectives du transfert ; et une approche directe faisant expérimentalement démonstration des événements de transfert.

Avec l'approche indirecte, les événements de transferts horizontaux sont déduits à partir de trois types possibles d'évidences tirées de la comparaison de séquences nucléiques (Gogarten & Townsend 2005; Ochman et al., 2000) :

- une dissonance entre la phylogénie des gènes étudiés et la phylogénie des organismes les hébergeant,
- une perte de syntonie (conservation de l'ordre des gènes) au-delà des blocs de gènes transférés,
- la proximité d'EGM (plasmide, séquences d'insertion, ICE,...) pouvant éventuellement expliquer le transfert.

Par exemple, les gènes de bêta-lactamase à spectre étendu *bla*_{CTX-M} retrouvés dans les isolats cliniques des entérobactéries ont une forte homologie avec les gènes chromosomiques de bêta-lactamase de *Kluyvera* spp. Dans le chromosome de *Kluyvera* spp., ces gènes sont localisés à proximité des séquences d'insertion *ISEcp1* et *ISCR1* qui ont très vraisemblablement permis leur mobilisation et transmission via, notamment, des transposons (Cantón 2012).

L'approche directe est, quant à elle, basée sur des études expérimentales mettant directement en évidence les événements de transfert par l'analyse des caractères acquis, modifiés ou perdus par les bactéries étudiées. A ce jour, la plupart des expériences de transfert réalisées en conditions environnementales se sont surtout focalisées sur la dissémination de plasmides conjugatifs, et plus rarement sur la transformation naturelle.

Les paragraphes suivants donnent un aperçu de différentes méthodes permettant de détecter le transfert de plasmides dans des matrices environnementales. Dans tous les cas, ces approches

reposent sur l'introduction d'une bactérie donneuse portant un plasmide d'intérêt dans une matrice quelconque où la présence de transconjugants sera ensuite détectée.

1. Les différentes méthodes de détection des événements de transfert

a) Détection basée sur la culture

Les approches basées sur la culture sont probablement les plus populaires et les plus faciles à réaliser. La plupart du temps, elles consistent à inoculer une matrice environnementale avec un couple de bactéries (une donneuse portant le plasmide d'intérêt et une receveuse) choisies pour leur caractéristiques sélectionnables (Sørensen et al., 2005). Après incubation, des transconjugants sont isolés et énumérés sur un milieu sélectif approprié (Figure 17).

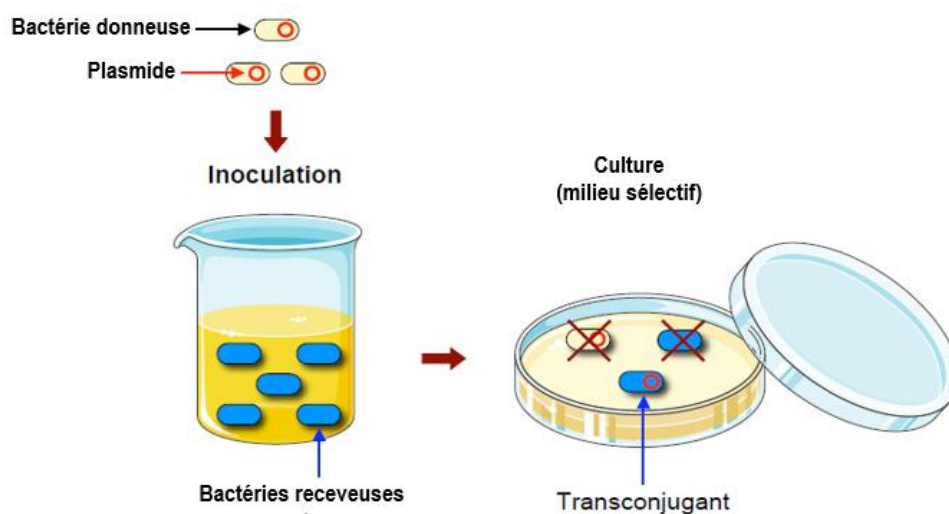


Figure 17. Etude de TGH par l'approche basée sur la culture en milieu sélectif (d'après C. Merlin).

Cette approche permet donc d'évaluer la permissivité d'un environnement ou d'une condition sur un transfert modèle. Doucet-Populaire et al., (1992) ont ainsi pu étudier le transfert du plasmide pAT191 (codant pour la résistance à la kanamycine) dans l'intestin des souris gnotobiotiques, grâce à un croisement modèle mettant en jeu une souche donneuse de *E. faecalis* et une souche receveuse de *E. coli* résistante à la tétracycline. Les transconjugants ont pu être détectés sur un milieu contenant les deux antibiotiques.

Bien que largement répandue, cette approche présente plusieurs limitations introduisant des biais dans l'appréciation des échanges génétiques. En effet, lorsque la flore autochtone est utilisée comme receveuse, on constate que :

- un marqueur de sélection évident n'est pas toujours disponible ;
- tous les transconjugants n'exprimeront pas nécessairement les marqueurs de sélections acquis ;
- la fraction de bactéries cultivées n'est pas représentative de la population bactérienne réelle (20-30% de la flore intestinale (Doré & Corthier 2010; Sørensen et al., 2005). Ces microorganismes non cultivables n'en demeurent pas moins des donneurs potentiels d'EGM susceptibles de continuer à jouer un rôle dans leur dissémination.

Globalement, ces limitations suggèrent que les transferts génétiques *in situ* sont sous-estimés lorsque l'on utilise seulement des approches basées sur la culture.

b) Détection basée sur la PCR quantitative

Récemment, des approches moléculaires basées sur la PCR quantitative ont permis de contourner les limitations associées aux méthodes culturales pour suivre le transfert de plasmides dans des communautés microbiennes complexes (Bonot & Merlin 2010). Dans cette approche, un plasmide d'intérêt est apporté à une communauté microbienne grâce à une bactérie donneuse. L'évolution de la quantité de plasmide et de son hôte donneur est suivie spécifiquement par PCR quantitative, au cours du temps, dans des extraits d'ADN totaux. En partant du principe que le transfert conjugatif est un mode de répllication intercellulaire, la dissémination du plasmide se manifeste par une augmentation du rapport « plasmide / bactérie donneuse » (Figure 18).

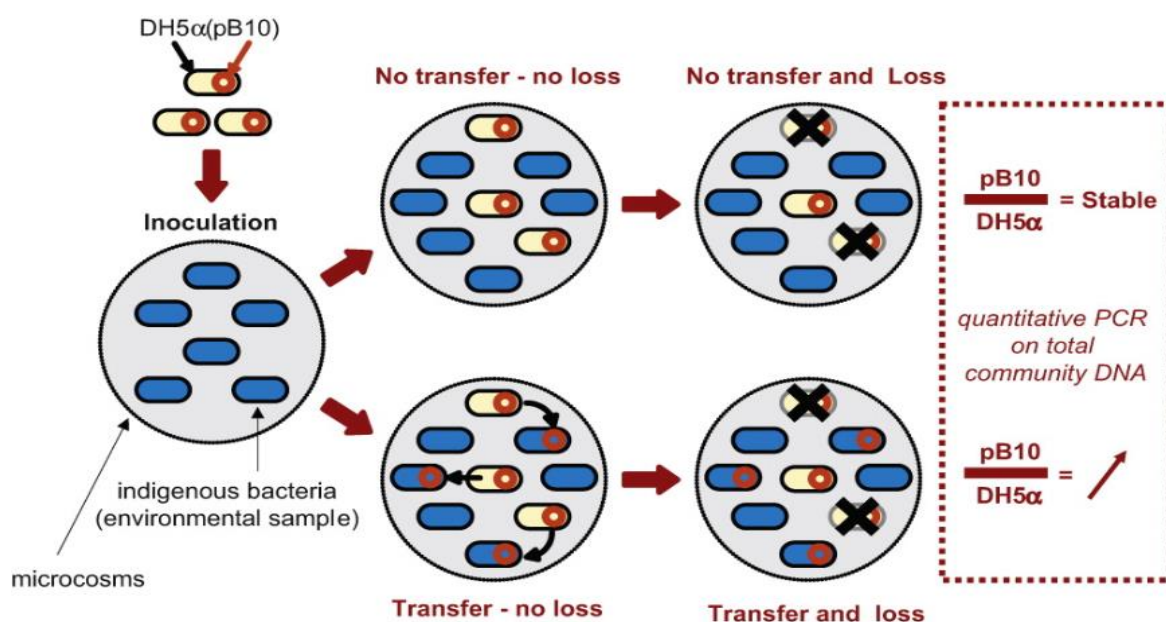


Figure 18. Principe d'étude de TGH par qPCR (Merlin et al. 2011).

Cette approche, élaborée simultanément par plusieurs laboratoires, dont le LCPME à Nancy, a déjà permis d'étudier le transfert des plasmides pB10 et pRE25 vers la microflore indigène de matrices aussi complexes que des boues de station d'épuration, des sédiments de rivière ou encore un fermenteur colique modèle (Merlin et al., 2011; Bonot & Merlin 2010; Haug et al., 2011). Précisons toutefois, que certains auteurs comme Haug et al. (2010; 2011) ont proposé une variante où la quantification de la bactérie donneuse, marquée par un gène *gfp*, est réalisée par comptage de bactéries fluorescentes. L'approche moléculaire présente plusieurs avantages par rapport à une démarche basée sur la culture :

- sa rapidité la rend applicable à un grand nombre d'échantillons simultanément ;
- une analyse directe de l'ADN permet de s'affranchir, à la fois, de la notion de cultivabilité et des problèmes liés au spectre d'hôtes dans lequel les marqueurs de sélection sont exprimés ;
- sa grande sensibilité permet d'étudier la dynamique des transferts en inoculant seulement une faible quantité de cellules donneuses. Ceci limite la perturbation des communautés indigènes par l'inoculum, comme c'est le cas dans les approches traditionnelles (van Elsas et al., 2004).

Cette approche ne permet cependant pas l'isolement de transconjugants, empêchant donc l'étude des hôtes susceptibles d'accueillir le plasmide transféré. Une telle démarche reste donc globale, et ne permet d'étudier le transfert de plasmides qu'à l'échelle du métagénome.

c) Détection basée sur la fluorescence

Des approches utilisant des gènes rapporteurs codant pour des protéines fluorescentes ont également été développées afin d'estimer le transfert de plasmides dans des milieux complexes (Sørensen et al., 2005). Ces approches sont particulièrement intéressantes quand on étudie les transferts de gènes dans des environnements naturels, puisque l'expression de la fluorescence ne nécessite aucun substrat particulier. Elles reposent sur l'utilisation d'un plasmide modèle, modifié par l'insertion d'une cassette codant pour une protéine fluorescente, tel que la GFP (pour *Green Fluorescent Protein*) ou la RFP (pour *red fluorescent protein*) (Christensen et al., 1996). Chez l'hôte donneur, la transcription du gène de la protéine fluorescente peut être réprimée par un répresseur codé par le chromosome de la donneuse si bien que la fluorescence n'est exprimable qu'après transfert vers des espèces dépourvues de répresseur (Figure 19).

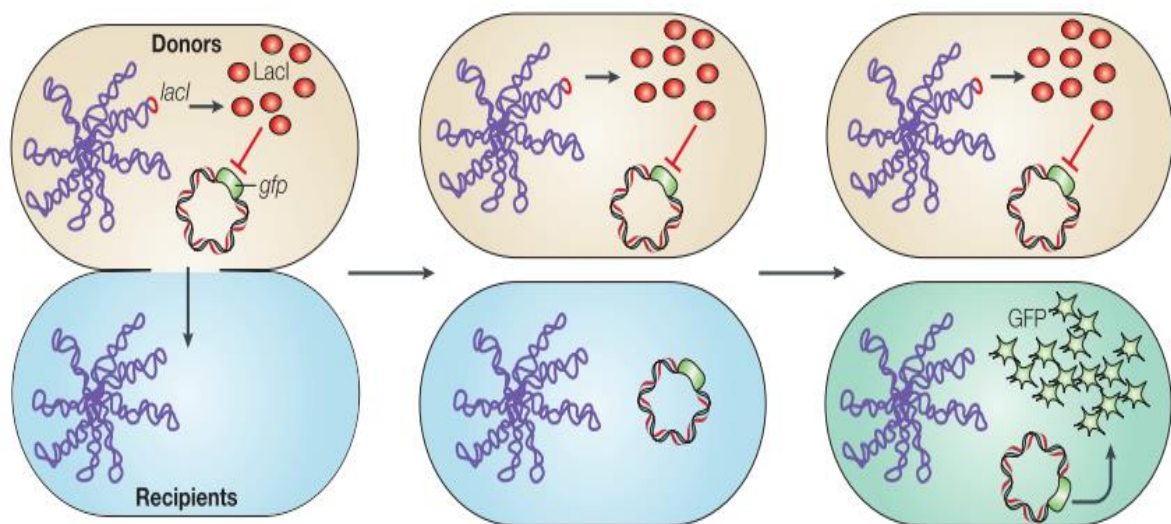


Figure 19. Etude des transferts de gènes par une approche basée sur la fluorescence (Sørensen et al. 2005).

Typiquement, le plasmide, modifié par un gène de GFP sous contrôle d'un promoteur P_{lac} , est placé dans une souche donneuse dont le chromosome code un gène $lacI^q$ (Normander et al., 1998). Des approches alternatives ont été proposées en marquant la bactérie donneuse par un second gène de protéine fluorescente intégré au chromosome, permettant ainsi de s'affranchir du problème de répression du gène de fluorescence plasmidique chez la bactérie donneuse (Haagensen et al., 2002). Il est alors possible de distinguer les souches donneuses (doublement marquées) des souches transconjugantes (marqueur plasmidique seul) par leur fluorescence (Sørensen et al., 2005).

En pratique, l'émission de fluorescence peut être examinée par microscopie à épifluorescence. C'est techniquement la seule méthode qui permet de localiser les zones de transfert dans une matrice complexe (Nancharaiah et al., 2003). Cette approche s'est, par exemple, avérée particulièrement intéressante dans l'étude de transfert de plasmides en biofilm (Haagensen et al., 2002; Król et al., 2011).

L'émission de fluorescence peut également être explorée en cytométrie en flux pour une énumération rapide et fiable des donneuses et des transconjugantes, permettant d'assurer la robustesse statistique des analyses. Cette technique a, par exemple, été utilisée pour quantifier le taux de transfert du plasmide pKJK10::gfp porté par une souche de *E. coli*:: $lacI^q$ vers une souche de

Pseudomonas putida, permettant une identification claire des populations cellulaires des donneuses et des transconjugants (Figure 20) (Sørensen et al., 2003).

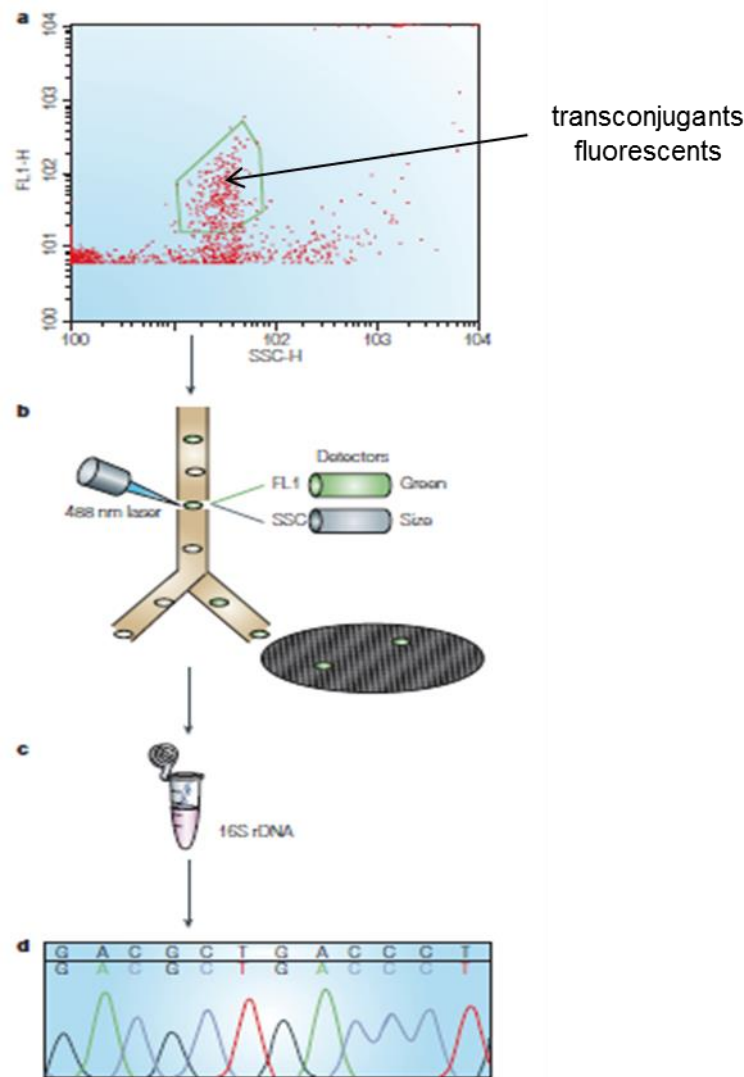


Figure 20. Détection des transconjugants par la cytométrie en flux.

a) diagramme de points de la fluorescence verte (FL1) versus granulométrie interne (SSC). La population des transconjugants exprimant la fluorescence verte est entourée par le cadre vert b) le tri cellulaire (FACS) sépare les cellules à fluorescence verte des cellules non fluorescentes sur un filtre-membrane c) l'ADN est extrait des cellules récupérées sur filtre. On amplifie le gène de l'ADNr 16S par PCR et on établit une collection de clones d) le séquençage des clones permet d'obtenir les informations sur la phylogénie des bactéries transconjugantes indigènes du milieu étudié (Sørensen et al. 2005).

Outre le comptage automatisé, le couplage de l'approche fluorescente et de la cytométrie présente aussi l'avantage d'utiliser un trieur cellulaire pour séparer et récupérer les transconjugants en fonction de la fluorescence émise. Les populations ainsi isolées pourraient ensuite être analysées par des méthodes moléculaires afin d'identifier leur appartenance phylogénique (Figure 20). Les seuls travaux ayant utilisé une telle approche sont ceux de Musovic et al., (2006). Ils ont identifié des transconjugants dans une population bactérienne de rhizosphère après l'inoculation d'une souche donneuse de *P. putida::lacI^q* (pKJK10 ::*gfp*).

Suivre le transfert de plasmide par une approche basée sur la fluorescence présente cependant quelques biais. Tout d'abord, les observations peuvent être limitées par la présence d'éléments autofluorescents dans les matrices naturelles (Sørensen et al., 2005; Bonot 2010). De

plus, le gène rapporteur inséré dans le génome bactérien ou sur le plasmide peut avoir des conséquences sur les propriétés du plasmide et de son hôte. En conséquence, la fréquence de transfert ou la physiologie globale de la bactérie peuvent être affectées (Sørensen et al., 2005). Enfin, l'expression des protéines fluorescentes peut varier selon l'hôte les hébergeant et selon les conditions environnementales (température, anaérobiose).

On retiendra donc que chaque approche élaborée pour suivre le transfert de plasmides au sein de communautés bactériennes complexes présente ses avantages et ses inconvénients. Ceci souligne l'intérêt d'associer plusieurs techniques qui apporteront des éclairages différents sur les TGH étudiés dans des modèles distincts.

2. Les différents modèles permettant d'étudier le transfert de gènes *in situ*

Le transfert de gènes a longtemps été étudié *in vitro* en utilisant des milieux liquides, à partir de souches pures. Cette approche, où tous les paramètres sont contrôlés (composition des milieux, température, durée de contact ...) est relativement réductrice, dans la mesure où elle ne rend pas compte de la complexité des communautés microbiennes et des conditions environnementales naturelles. Afin de mimer ces communautés bactériennes complexes, de nombreux modèles *ex vivo* et *in vivo* ont été élaborés. On s'intéressera plus particulièrement aux modèles expérimentaux permettant d'étudier les transferts de gènes au sein du microbiote intestinal.

Des systèmes *ex vivo*, reproduisant partiellement les conditions du milieu intestinal, ont été utilisés avec succès pour étudier l'influence de certains paramètres sur les conditions de transfert des gènes (Blake et al., 2003). Par exemple, Haug et al. (2011) ontensemencé un fermenteur avec des fèces humaines afin de mimer l'environnement colique et l'ont inoculé avec une souche de *E faecalis* contenant le plasmide conjugatif de multirésistance pRE25*. Ce travail a notamment permis de montrer que, dans un environnement reproduisant le microbiote intestinal humain, ce plasmide de résistance aux antibiotiques pouvait être transféré à une bactérie pathogène co-inoculée (*L. monocytogenes*) et à d'autres membres indigènes de la flore digestive, tels que *Enterococcus avium* (Haug et al., 2011). Ces derniers constitueront à leur tour un réservoir intestinal de gènes de résistance. Les modèles *ex vivo* ont des limites, puisqu'ils ne rendent pas compte de l'ensemble des facteurs mis en jeu : réaction immunitaire de l'hôte ou variabilité des communautés bactériennes tout au long du tube digestif, notamment (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau 2010; Doré & Corthier 2010).

Bien que plus difficiles à mettre en œuvre, les modèles animaux reflètent mieux la diversité et la complexité de l'environnement intestinal. Les expérimentations les plus répandues sont effectuées sur les rongeurs dont le tractus intestinal partage des caractères communs avec l'intestin humain (Schjørring & Krogfelt 2011).

On distingue plusieurs modèles possibles utilisant soit des animaux axéniques (sans flore intestinale), soit des animaux gnotobiotiques (ensemencés avec une flore présélectionnée), ou encore des animaux avec un microbiote natif. Ce dernier modèle présente vraisemblablement l'avantage de se rapprocher le plus possible des conditions naturelles, de prendre en compte la diversité naturelle et l'effet barrière de la flore indigène contre l'implantation de souches exogènes (van der Waaij et al., 1971).

Ces différents modèles animaux ainsi que leur utilisation dans le cadre de l'étude des transferts de gènes ont été revus par Schjørring & Krogfelt (2011). Dans tous les cas de figure, les expériences proposées consistent à inoculer l'animal avec des bactéries donneuses et receveuses, et de rechercher des transconjugants dans les contenus intestinaux et les fèces. A notre connaissance,

la flore intestinale receveuse n'a jamais encore été utilisée en tant que système receveur dans des études *in vivo*. Quoiqu'il en soit, la plus grosse difficulté rencontrée dans les études *in vivo* mettant en jeu le microbiote natif, réside dans l'effet de barrière. Il est cependant possible de le contourner en administrant certains antibiotiques (ampicilline, clindamycine, métronidazole, kanamycine, streptomycine) qui baissent l'abondance de certaines sous-populations indigènes, libérant ainsi une niche pour l'implantation de la souche bactérienne inoculée (Hentges et al., 1985).

La détection des transconjugants dans les modèles animaux à flore native reste toutefois beaucoup plus difficile, car leur nombre peut se situer en dessous des limites de détection des méthodes appliquées (Licht et al., 1999; Feld et al., 2008). Cependant, si le nombre des transconjugants et leur persistance peuvent être estimés avec des techniques suffisamment sensibles, ces informations reflèteront mieux les risques réels de la dissémination des gènes par le biais du réservoir intestinal animal et humain.

II. Problématique et objectifs du travail

L'utilisation massive des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire favorise l'émergence des bactéries multirésistantes, un défi croissant en termes de contrôle des infections bactériennes (Carlet et al. 2012). L'échange des éléments génétiques mobiles entre les bactéries constitue une des voies importantes de la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques. L'intestin des mammifères constitue un réservoir conséquent de ces gènes et des EGM qui les véhiculent (Rolain 2013). De plus, le tube digestif représente un lieu propice aux transferts de gènes (Aminov 2011). Il semble donc légitime et nécessaire d'explorer les mécanismes de transfert de gènes de résistance dans le milieu intestinal.

La plupart des travaux portant sur ce domaine se sont intéressés au rôle des antibiotiques dans la stimulation des échanges génétiques (Bahl et al., 2004; Doucet-Populaire et al., 1991). Cependant, certains arguments suggèrent l'existence de stimuli de transfert autres que la pression antibiotique seule. On a constaté, par exemple, une forte prévalence du gène *tetQ* chez les *Bacteroides* sp. intestinaux bien avant l'introduction massive de la tétracycline dans la thérapeutique (Salysers et al., 2004). Dans ce contexte, l'Equipe d'Accueil 7300 'Stress Immunité Pathogènes' de l'Université de Lorraine s'intéresse actuellement plus particulièrement à l'influence du stress chronique de l'hôte sur les échanges génétiques entre bactéries au sein du microbiote intestinal.

Or, l'exploration des THG *in vivo* reste difficile et encore peu répandue (Tableau 2 et 3). Quelques équipes seulement ont travaillé sur des mammifères avec un microbiote natif (Lester et al., 2004; Feld et al. 2008; Lester et al., 2006; Licht et al., 1999; Licht et al., 2003; Schjørring et al., 2008). Dans la majorité des cas, la détection des transconjugants a été faite par culture sur milieux sélectifs. Compte tenu des points faibles d'une telle approche (faible nombre d'espèces intestinales cultivables, variabilité d'expression de résistance chez les transconjugants...), il semble nécessaire d'élaborer un nouveau modèle d'étude des transferts des gènes *in vivo*.

L'objectif de ce travail a été de définir les caractéristiques expérimentales optimales permettant d'explorer à l'aide de méthodes plus sensibles que la culture, à savoir la qPCR et la cytométrie en flux, le devenir d'une bactérie donneuse possédant un plasmide d'intérêt et la diffusion de ce dernier au sein du microbiote intestinal murin.

La première étape de ce travail a consisté à optimiser la stratégie expérimentale (inoculation, souches donneuses utilisées, collecte des échantillons ...) d'après les données de la littérature. Nous avons ensuite évalué les performances d'une méthode de PCR quantitative et d'une méthode de cytométrie en flux pour étudier, après inoculation orale, le devenir de deux souches de *E. coli* et de leur plasmide (pB10) dans les fèces murines.

III. Matériel et méthodes

A. *Modèle animal*

1. **Modèle murin**

Les modèles animaux reproduisant le plus fidèlement la complexité des conditions intestinales humaines sont les modèles murins avec un microbiote naturel. Or, dans le contexte du laboratoire, nous nous intéressons aux effets du stress de l'hôte sur la qualité et le comportement du microbiote intestinal. Nous avons donc exclu la possibilité de travailler avec des souris axéniques ou gnotobiotiques et notre choix s'est porté sur des souris avec flore intestinale native, C57BL/6. Cette souche de souris a été utilisée car les autres travaux microbiologiques et immunologiques de l'équipe sont effectués à l'aide de C57BL/6.

Des souris C57BL/6 mâles d'un même lot, âgées de 8 semaines (Charles River, Arbresle, France), ont donc été utilisées. Elles ont été maintenues dans des cages individuelles à usage unique (Tecniplast SUMC, France) avec couvercle filtrant, mangeoire et biberon à usage unique. Les cages étaient placées dans une armoire ventilée, thermo-régulée avec rythme nycthémeral réglable 12h/12h (A-BOX, Noroit, France). Le fond des cages était recouvert d'une litière de cellulose. Les souris étaient alimentées *ad libitum* avec une nourriture standard (granulés, Special Diets Services, Royaume Uni) et recevaient de l'eau stérile *ad libitum* avec ou sans antibiotique. L'ensemble des expérimentations animales ont été réalisées dans le respect de la réglementation en vigueur.

2. **Stratégie expérimentale**

Une recherche bibliographique (Tableau 4) a permis de définir la stratégie expérimentale :

- la nature et les modes d'administration de l'antibiotique utilisé pour exercer une pression de sélection,
- les modalités d'inoculation des souches bactériennes étudiées,
- la durée de suivi des souris post inoculation.

Tableau 4. Résumé des caractéristiques expérimentales de différentes études de TGH *in vivo*.

(d'après la bibliographie des études du transfert horizontal de gènes dans l'environnement intestinal des animaux avec microbiote natif. Abréviations : admin. – administration; UFC – unité formant colonie, p.o. – *per os*, administration orale).

Environnement intestinal	Durée (jours)	Antibiotique (molécule, dose, mode admin., début avant inoculation)	Inoculum donneuse (UFC)	Mode d'inoculation	Souche donneuse	Souche receveuse	Elément mobile	Référence
Souris	19	Streptomycine 0,5 g/L, eau, 24h	3.10^8	p.o. après 24h de jeûne, 100µL, suspension dans saccharose 20%	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.coli</i> MG1655	5 plasmides	Schjorring et al. 2008
Souris	18	Streptomycine 5 g/L, eau, 24h	2.10^9	p.o. 200µL, suspension dans NaCl 0,9%	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	pCAL 1, pCAL2	Lester et al. 2004
Souris	15	Streptomycine 5 g/L, eau, 24h	9.10^8	p.o. 100µL, suspension dans saccharose 20%	<i>E coli</i>	<i>E. coli</i>	pR1drd19, RP4	Licht et al. 1999
Souris		Erythromycine, eau		gavage	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	pAMβ	Igimi et al. 1996
Rats axéniques, souris	18	Streptomycine 1 g/L ou érythromycine 0,025 mg/souris, eau, 24h	10^8	p.o. suspension dans saccharose 20%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>E. faecalis</i>	pLFE1 (<i>ermB</i>)	Feld et al. 2008
Mini-cochons	79	Streptomycine 5 g/L, eau	$4,7.10^8$	25 ml de culture liquide mélangé à la nourriture	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	pCF10	Licht et al. 2002

La démarche expérimentale adoptée est présentée dans la Figure 21. Les études *in vivo* ont été réalisées avec deux souches bactériennes donneuses : *E. coli* DH5 α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) et *E. coli* Δ *fli* (pB10::r*fp*). Pour l'évaluation de chacune de ces souches, 6 souris « test » ont été inoculées avec une suspension (200 μ L) de la souche bactérienne étudiée (6.10^7 UFC) et 6 souris « témoins » avec une solution stérile (200 μ L). Au total 24 souris ont été utilisées :

- 6 souris (P1-P6) ont été inoculées avec une suspension de *E. coli* DH5 α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*)
- 6 souris (F1-F6) ont été inoculées avec une suspension de *E. coli* Δ *fli* (pB10::r*fp*)
- 12 souris (T1-T12) ont reçu une solution stérile de saccharose à 20% dans du LB.

Les suspensions ont été préparées, après ajustement de la DO à 600 nm, dans une solution de LB stérile à 20 % de saccharose (LB-Miller, Difco, Rungis, France). Cette solution a été utilisée pour l'inoculation des souris témoins. Pour l'inoculation des souches bactériennes, nous avons renoncé au gavage. En effet, il constitue une source de stress. Or, notre modèle devait permettre *in fine* d'étudier l'influence de stress sur le TGH *in vivo*. Nous avons donc adopté la modalité d'inoculation la moins traumatisante, à savoir l'administration orale à l'aide d'une pipette.

Pour assurer l'ingestion de la totalité de l'inoculum, dix-huit heures avant l'inoculation, toutes les souris ont été mises à jeun (en eau et en nourriture). Après l'inoculation, l'eau et la nourriture ont été remises *ad libitum*.

Nous avons choisi d'administrer de la streptomycine, utilisée dans différentes études de transfert de gènes *in vivo*, en raison de son impact relativement ciblé sur la flore intestinale (Sekirov et al., 2008). Deux doses de streptomycine ont été utilisées. La dose la plus forte (5g/L) est celle utilisée par la majorité des auteurs (Tableau 4). La dose la plus faible (0,5 g/L) permet d'obtenir des concentrations intra-luminales proches de celles observées en thérapeutique humaine (Sekirov et al., 2008). Nous avons également évalué le degré de colonisation des souches étudiées en l'absence de streptomycine afin de savoir s'il était possible de se départir de ce facteur confondant éventuel dans des études ultérieures. Ainsi, deux jours avant l'inoculation et durant les 15 jours qui ont suivi, de l'eau stérile sans antibiotique ou additionnée de sulfate de streptomycine (Sigma-Aldrich, Lyon, France) à 0,5 ou 5 g/L a été administrée aux souris selon le schéma suivant :

- souris P1, P2, F1, F2 et T1-T4 : solution de streptomycine à 5 g/L,
- souris P3, P4, F3, F4 et T5-T8 : solution de streptomycine à 0,5 g/L
- souris P5, P6, F5, F6 et T9-T12 : eau stérile.

Les solutions aqueuses ont été renouvelées tous les 3 jours afin d'éviter la dégradation de l'antibiotique.

La cinétique d'apparition de transconjugants a, jusqu'à ce jour, été étudiée seulement dans les modèles mettant en jeu une souche donneuse et une souche receveuse (Tableau 4). Dans ces conditions, les transconjugants émergeaient rapidement après l'inoculation de la donneuse. Certaines études ont toutefois rapporté une détection tardive des transconjugants (à J₂₃ ; Schjorring et al. 2008). Prenant en compte ces éléments, la collecte des fèces a été effectuée selon le schéma suivant :

- pour les souris témoins : J₋₃, J₀, J₅, J₁₀ et J₁₅
- pour les souris test : J₀, J₁, J₂, J₃, J₅, J₇, J₉, J₁₁, J₁₃ et J₁₅.

Il est à souligner que toutes les expérimentations réalisées hors armoires ventilées, ont été réalisées dans des pièces séparées selon qu'il s'agissait de souris « test » ou de souris « témoins ». De plus, ces manipulations ont été réalisées sous PSM lorsqu'il s'agissait de souris « test ».

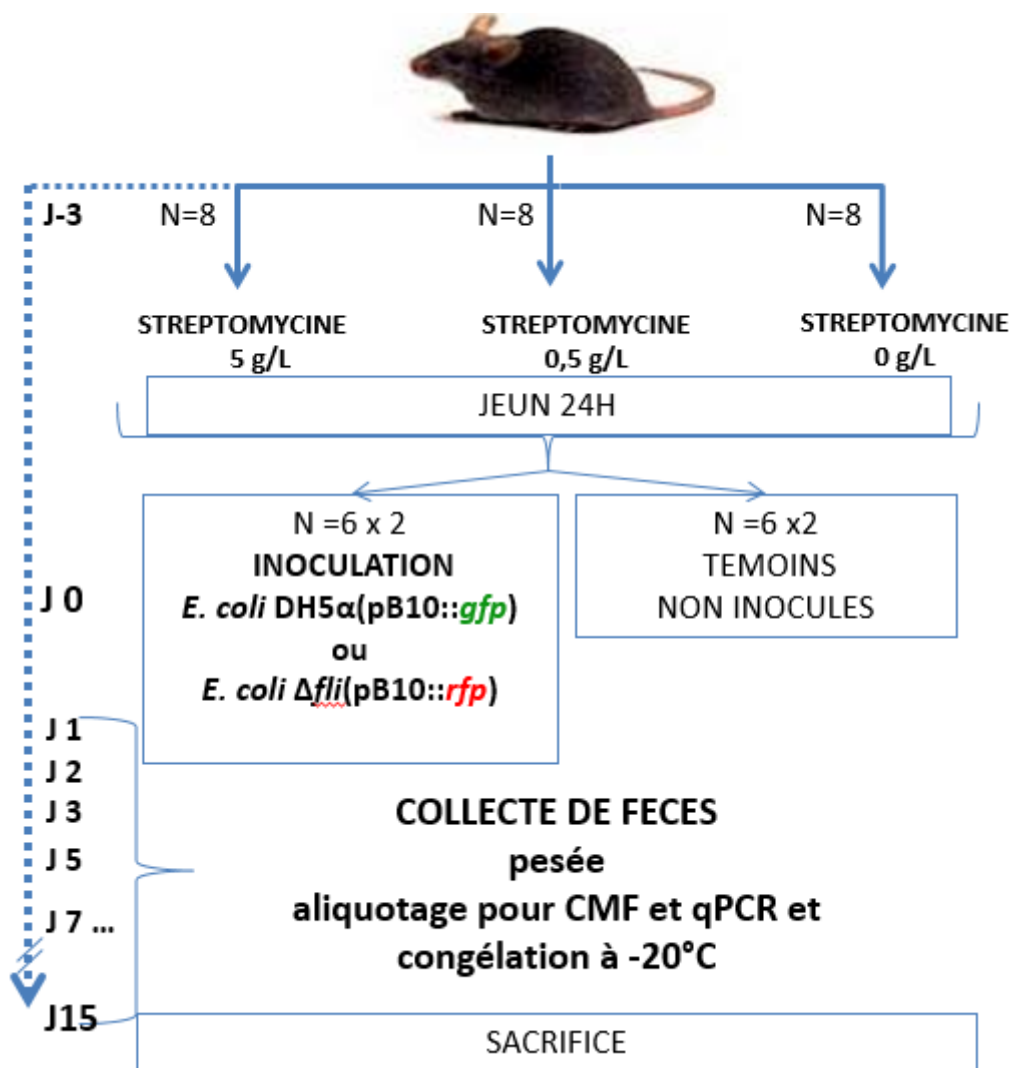


Figure 21. Stratégie expérimentale établie pour l'inoculation et l'échantillonnage de souris.

En fin d'expérimentation (J₁₅), les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale après avoir été endormies à l'isoflurane, afin de récupérer le contenu intra-luminal de différentes portions de l'intestin (grêle, caecum, colon). Ces derniers prélèvements ont été conservés à -80°C.

B. Cultures bactériennes et conjugaisons

1. Choix du plasmide et des bactéries donneuses pour l'étude de TGH *in vivo*

a) Plasmide pB10

Le plasmide pB10 a été choisi comme modèle en raison des différents avantages qu'il procure :

- il s'agit d'un plasmide naturel de 64,5 kb isolé de boues de station d'épuration. Par conséquent, il pourrait provenir d'un hôte bactérien originaire de matière fécale ;

- il appartient à la famille des plasmides à large spectre d'hôte IncP-1 et se transfère par conjugaison avec une grande efficacité (plus de 80% de transfert en croisement biparental) (Younes Bou Orom, 2008, LCPME, Master 2) ;
- la connaissance de sa séquence donne accès à des approches expérimentales mettant en jeu de la biologie moléculaire.

Bonot & Merlin (2010) ont identifié une région unique dans la structure de pB10 qui a permis d'élaborer des amorces et une sonde spécifique permettant la détection de ce plasmide par qPCR (Tableau 11).

Par ailleurs, le plasmide pB10 a été modifié en insérant un transposon mini-Tn5-*gfp*, ce qui rend l'élément détectable par l'émission de fluorescence verte. Lors de ce travail, Bonot (2010) a obtenu plusieurs plasmides, avec différents sites d'insertion du transposon (Figure 22). Les tests effectués sur des souches possédant ces différents plasmides avaient montré qu'une des insertions (pB10::mini-Tn5-*gfp*-1) influait peu les propriétés du plasmide et la physiologie de la cellule hôte. Cette construction a donc été choisie pour notre étude.

L'expression de la GFP par les bactéries portant le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp* permet de les détecter en cytométrie en flux (CMF). Dans ce plasmide, le gène de la GFP est sous le contrôle d'un promoteur *P_{lac}* et ne peut donc s'exprimer que dans un contexte génétique dépourvu du répresseur LacI (ou faiblement pourvu en LacI). C'est le cas de *E. coli* DH5 α , la souche donneuse choisie pour cette étude.

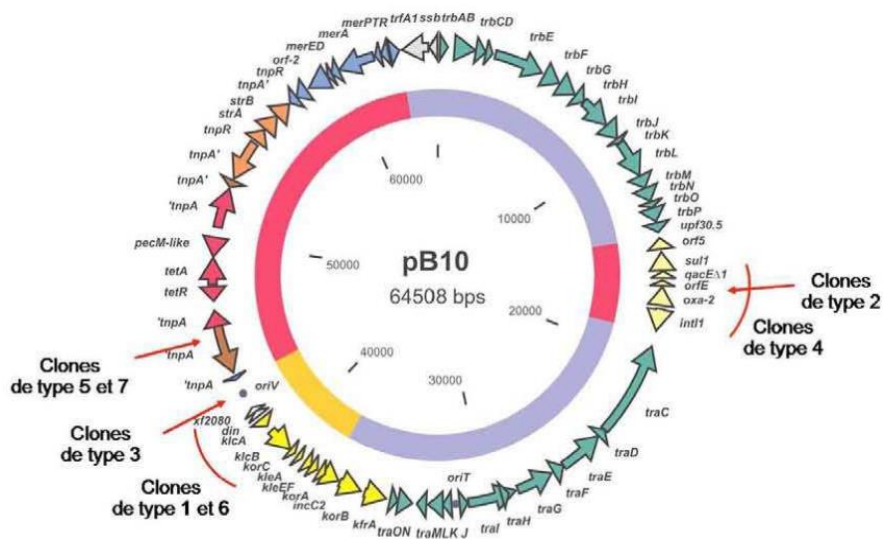


Figure 22. Structure génétique du plasmide pB10 (d'après Schlüter et al., 2003)

Les gènes sont représentés par des flèches indiquant le sens de la transcription. Le code couleur utilisé identifie les gènes impliqués dans une même fonction ou structure. La localisation des insertions du mini-Tn5-*gfp* sur la structure du plasmide est indiquée par des flèches rouges. Le clone de type 1 (pB10::mini-Tn5-*gfp* 1) a été choisi pour cette étude.

b) *E. coli* DH5 α

La souche de *E. coli* DH5 α (Tableau 5) a été choisie comme vecteur du plasmide car elle possède une séquence unique (la jonction des régions flanquant la délétion $\Delta(\arg F-lac)U169$) permettant sa détection spécifique par qPCR (Bonot & Merlin 2010). Elle colonise peu l'intestin après l'inoculation orale et n'est pas pathogène pour la souris (Chart et al., 2000). Cette élimination rapide de la souche peut être assimilée à la présence éphémère de bactéries exogènes transitant par le tube digestif des mammifères. L'absence de colonisation

pourrait être envisagée comme un avantage, puisqu'une disparition rapide de la souche donneuse rend la détection de transconjugants plus facile. *A contrario*, un passage intestinal trop rapide pourrait empêcher la survenue des événements de transfert.

c) *E. coli* Δ *fli*

Cette souche a été obtenue à partir de *E. coli* MG1655 après deux altérations génétiques dans son chromosome (Tableau 5) :

- une délétion de gènes *fliE-fliR* (flagelle) remplacés par un vecteur de clonage portant le gène *cat* (résistance au chloramphénicol) ;

- une insertion des gènes *amp* (résistance à l'ampicilline) et *gfp* (fluorescence verte due à la production de la GFP).

E. coli Δ *fli* a servi à la construction d'une souche donneuse qui, après introduction du plasmide pB10::*rfp*, disposait d'un marquage chromosomique et plasmidique. Ceci a été réalisé afin de pouvoir suivre par CMF le devenir de ce plasmide et de la souche donneuse au sein du microbiote intestinal.

De plus, nous avons posé l'hypothèse que *E. coli* MG1655 Δ *fli* avait, du fait des altérations des gènes flagellaires et par analogie à ce qui a été montré par Gauger et al. (2007), un pouvoir de colonisation supérieur à *E. coli* DH5 α .

2. Souches bactériennes et milieux de culture utilisés

Les caractéristiques de l'ensemble des souches utilisées dans notre travail sont décrites dans le Tableau 5.

Cupriavidus necator, *E. coli* DH5 α , *E. coli* Δ *fli* et *E. coli* CM275, utilisées pour la construction des souches donneuses, ont été obtenues de la collection de Christophe Merlin (LCPME). Ces souches étaient conservées en milieu glycérolé à -80°C. Les cultures ont été réalisées en milieu riche « LB-Miller » (Difco, BD, Le Pont-des-Claix, France). Pour les milieux solides, de l'agar a été ajouté à 15 g.L⁻¹. Les cultures ont été incubées à 30°C (*Cupriavidus necator*) ou à 37°C (*E. coli*) en aérobie. Les cultures liquides ont été effectuées au bain-marie agitant. Sauf exceptions (spécifiées dans le texte), une pression de sélection a été maintenue par ajout au milieu de culture d'un ou plusieurs des antibiotiques suivants : rifampicine (100 µg.mL⁻¹), tétracycline (20 µg.mL⁻¹), kanamycine (100 µg.mL⁻¹), acide nalidixique (20 µg.mL⁻¹), streptomycine (100 µg.mL⁻¹), ampicilline (100 µg.mL⁻¹).

Prevotella baroniae DSMZ 16972^T, *Mycobacterium chelonae* CIP 104535^T, *Enterococcus faecium* BM 4339 et *Bacteroides thetaiotaomicron* ATTC 29741 ont été utilisées pour valider la méthode d'extraction d'ADN de fèces. Ces souches ont été conservées en milieu glycérolé à -80°C. Les conditions de culture ont été les suivantes :

- *P. baroniae* et *B. thetaiotaomicron* : Brucella agar (Sigma-Aldrich, Lyon, France) avec adjonction d'hémine et de vitamine K incubé à 37°C en anaérobiose.

- *M. chelonae* et *E. faecium* : milieu TSS (bioMérieux, Craponne, France) incubé à 37°C en aérobie.

Tableau 5. Souches bactériennes

Identifiant ^a	Souche/noms	Génotypes ^b /caractéristiques ^c	Référence/origine
Souches utilisées pour l'élaboration du modèle de détection de TGH <i>in vivo</i>			
CM224	<i>Cupriavidus necator</i> JMP228::lacI ⁺ (pB10::miniTn5-gfp-1)	Rif ^R , Amx ^R , Str ^R , Sul ^R , Tet ^R	Bonot 2010
CM 55	<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80 lacZΔM15 recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^R) thi-1 hsdR17(r _K -, m _K +) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169	Sambrook et al. 1989
CM363	<i>Escherichia coli</i> DH5α (pB10::miniTn5-gfp-1)	Nal ^R , Amx ^R , Str ^R , Sul ^R , Tet ^R , GFP ⁺	cette étude
CM275	<i>Escherichia coli</i> MG1655 (pB10::rfp)	F ⁺ λ ⁺ ilvG ⁺ rfb ⁻⁵⁰ rph ⁻¹ Amx ^R , Str ^R , Sul ^R , Tet ^R , Km ^R , RFP ⁺	De Gelder et al. 2005
CM358	<i>Escherichia coli</i> MG1655 gfp Δfli	λattamp ₋ gfp (Ap ^R GFP ⁺), ΔfliE-R::cat (Cm ^R)	Francius et al. 2011
LBM13	<i>Escherichia coli</i> MG1655 gfp Δfli (pB10::rfp)	λattamp ₋ gfp (Ap ^R GFP ⁺), ΔfliE-R::cat (Cm ^R) Str ^R , Sul ^R , Tet ^R , Km ^R , RFP ⁺	cette étude
Souches utilisées dans le choix de la méthode d'extraction d'ADN de fèces des souris			
DSMZ 16972 ^T	<i>Prevotella baroniae</i>	nimI	Alauzet et al. 2010
CIP 104535 ^T	<i>Mycobacterium chelonae</i>	ITS	Skerman ed.1989
BM 4339	<i>Enterococcus faecium</i>	vanD	Perichon et al. 1997
ATTC 29741	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	rrn16S	Teng et al. 2004

(a) ATTC : American Type Culture Collection ; CIP : Collection de l'Institut Pasteur ; DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

(b) Les descriptions de gènes respectent la nomenclature génétique en vigueur.

(c) Ap^R, Amx^R, Cm^R, Km^R, Nal^R, Rif^R, Str^R, Sul^R, Tet^R : résistances à l'ampicilline, l'amoxicilline, le chloramphénicol, la kanamycine, l'acide nalidixique, la rifampicine, la streptomycine, la sulfaméthoxazole et la tétracycline respectivement. GFP⁺, RFP⁺ : production de la « Green Fluorescent Protein » et de la « Red Fluorescent Protein » respectivement.

3. Conjugaison bactérienne

Pour construire la souche de *E. coli* DH5α et Δfli portant les plasmides marqués, nous avons effectués des conjugaisons sur milieux solides. Pour ce faire, les bactéries donneuses du plasmide d'intérêt et les bactéries receveuses (cf. § précédent) ont été cultivées séparément pendant 16 heures à 30°C ou à 37°C respectivement, en milieu LB liquide. Puis, 50 μL de

chaque suspension ont été mélangés sur une boîte de milieu LB gélosé. En parallèle, 50 µL de chaque suspension ont été déposés sur milieu LB afin de servir de contrôle. Les milieux ont été incubés 16 h à 30°C ou 37°C. Après conjugaison, les bactéries du mélange ont été étalées sur des milieux sélectifs permettant de sélectionner les bactéries transconjugantes (ayant reçu le plasmide à l'issue de la conjugaison bactérienne). Après croissance à 37°C, les colonies bactériennes sélectionnées ont de nouveau été purifiées sur le même milieu sélectif.

Ainsi, pour obtenir DH5α(pB10::mini-Tn5-*gfp1*), la bactérie donneuse *Cupriavidus necator* (CM224) contenant le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp1* a été conjuguée avec la bactérie receveuse *E. coli* DH5α (CM55). Des transconjugants DH5α(pB10::mini-Tn5-*gfp1*) ont ensuite été sélectionnés sur milieu LB supplémenté en acide nalidixique (résistance portée par DH5α) et tétracycline (résistance portée par pB10) à 37°C (une température qui n'autorise pas la croissance de *C. necator*).

Pour la construction de Δ*fli*(pB10::r*fp*), nous avons introduit le plasmide pB10::r*fp* de *E. coli* CM275 dans la souche de *E. coli* MG1655 Δ*fli* CM358. Des transconjugants ont été sélectionnés sur milieu LB supplémenté en ampicilline (résistance de CM358) et en tétracycline (résistance portée par pB10) à 37°C.

4. Vérification des transconjugants par PCR et microscopie à épifluorescence

Après isolement sur milieux sélectifs, la qualité des transconjugants obtenus a été vérifiée par PCR en utilisant des amorces ciblant :

- la région Δ(*argF-lac*) U169 pour *E. coli* DH5α (CM363) ;
- la région Δ*fli* pour *E. coli* Δ*fli* (LBM13) ;
- la région tronquée du gène *tnpA* codant pour la transposase de l'IS1071 pour pB10.

Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans les Tableaux 11, 12 et 13. Les réactions de PCR ont été réalisées selon les protocoles détaillés en § III C 3 e.

Par ailleurs, l'émission de fluorescence verte (pour le gène *gfp*) ou rouge (pour le gène *rfp*) a été recherchée en microscopie à épifluorescence. Pour cela, quelques colonies de bactéries cultivées sur milieu gélosé (24-48 heures de croissance) ont été collectées et remises en suspension dans 10 µL de tampon phosphate salin (PBS). La suspension a été placée sur lame, séchée, lutée (milieu de montage Eukitt 03989, FLUKA, Sigma-Aldrich) puis observée à l'objectif à immersion x100 en contraste de phase et en microscopie à fluorescence (λ_{EX} 490 nm – filtre d'émission : λ_{EM} 520 nm pour la fluorescence verte et λ_{EX} 540 nm - filtre d'émission : λ_{EM} 610 nm pour la fluorescence rouge) avec un microscope à épifluorescence (Olympus VS 120, Olympus, Center Valley, PA, Etats-Unis).

C. Biologie moléculaire

1. Extraction et purification de l'ADN total à partir du matériel fécal murin

a) Les méthodes d'extraction testées

La première partie de ce travail a consisté à choisir une méthode d'extraction de l'ADN à partir du matériel fécal murin en comparant l'efficacité de sept techniques. En se basant sur le principe de lyse cellulaire, elles pouvaient être regroupées comme suit :

1. Quatre procédés utilisant une lyse chimique et enzymatique de parois cellulaires :
 - a. une méthode commercialisée pour l'extraction des ADN à partir des souches bactériennes à Gram positif (MasterPure Gram Positive DNA

- Purification Kit ; Epicenter, Madison, WI, Etats-Unis) (appelée ultérieurement MG+) avec ajout d'une étape supplémentaire de purification en phénol/chloroforme,
- une méthode semi-automatisée (NucliSENS sur l'automate EasyMAG de bioMérieux) (EM),
 - une trousse commercialisée, spécialisée dans l'extraction d'ADN à partir de milieux fécaux (QuiAmp DNA Stool Mini Kit ; Quiagen, Hilden, Germany) (QS),
 - une méthode manuelle utilisée pour extraire de l'ADN bactérien à partir de boues de station d'épuration (Bonot *et al*, 2010) (BO).
- Trois méthodes utilisant une lyse cellulaire mécanique par agitation avec des billes :
 - la trousse ZR Fecal DNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, Etats-Unis),
 - le coffret FastDNA SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals, Solon, OH, Etats-Unis),
 - le coffret FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals).
- Pour les trois dernières trousse, l'agitation avec des billes a été effectuée à l'aide de FastPrep Instrument (MP Biomedicals) à 6,0 ms⁻¹ pendant 40 secondes.
- Les principales caractéristiques de toutes les méthodes sont décrites dans le Tableau 6.

Tableau 6. Caractéristiques des méthodes d'extraction d'ADN comparées.

Abréviation	Méthode d'extraction	Méthode de lyse cellulaire ^a	Récupération de l'ADN	Coût moyen ^c (€/coffret)	Temps de manipulation ^e
Lyse chimique et enzymatique					
MG+ phénol	MasterPure Gram Positive	L, TLC	précipitation	209	24h
QS	QuiAmp DNA Stool	TLC, T	colonne de silice	211	2h
EM	EasyMag	TLC	particules de silice magnétisées	111 ^d	1h15min
Protocole manuel (lyse chimique et physique – sonication)					
BO	Bonot et al. 2010	SDS, US	précipitation	-	48h
Lyse mécanique et chimique					
ZR	ZR fecal	billes, TLC	colonne de matrice HRD	227	1h
FpF	FastDNA for feces	billes, TLC	colonne de silice	386	1h15min
FpS	FastDNA for soil	billes, TLC	colonne de silice	386	1h30min

^a Si spécifiée, L=lysosyme, T=température, TLC=tampon de lyse cellulaire, SDS=sodium dodécyl sulphate.

^b Quelques éléments si spécifiés, PK=protéinase K, βME= bêta-mercaptoéthanol.

^c Prix catalogues en ligne consultés en juillet 2013 (basés sur 50 purifications pour QS, ZR, FpF, FpS, 100 purifications pour MG+).

^d Coût moyen pour 16 échantillons d'après Dundas et al. (2008).

^e Temps moyen pour extraire l'ADN à partir de 12 échantillons.

Après quelques tests préliminaires réalisés sur des échantillons de fèces murines et de contenus intra-caecaux de masse différente (25 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg), la comparaison a été effectuée sur les échantillons de 50 mg (en cinq répétitions par méthode).

Les fèces étant très secs, tous les échantillons ont été suspendus dans du PBS additionné de 0,1% de Tween 80 (humidification) pendant 10 minutes puis vortexés pendant 1 min.

b) Evaluation de la concentration et de la qualité des ADN extraits

La concentration en ADN dans les échantillons a été déterminée par deux méthodes : fluorimétrie (Qubit® dsDNA HS Assay avec fluorimètre Qubit 2.0 ; Carlsbad, CA, USA) et spectrophotométrie UV (spectrophotomètre NanoDrop® Technologies, Wilmington, DE, USA). Avec le fluorimètre, la concentration en ADN peut être évaluée en utilisant un agent intercalant fluorescent spécifique de l'ADN double brin. En spectrophotométrie, la concentration en ADN est estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm où une unité d'absorbance en UV correspond à 50 µg.mL⁻¹ d'ADN double brin.

La présence d'éventuelles contaminations a été évaluée par des mesures d'absorbance à 280 nm. Le rapport A260 / A280 doit être compris entre 1,8 et 2 pour relater un bon niveau de pureté de l'ADN. Un rapport inférieur à 1,8 est le signe d'une contamination de l'extrait par les protéines. Un rapport supérieur à 2 est le signe d'une contamination par des ARN.

Le niveau de dégradation des ADN extraits a été estimé par l'étude de la taille et du nombre de fragments (Bio-Rad Gel DOC system, Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, Etats-Unis) après séparation par électrophorèse (90 min à 50V) sur gel d'agarose à 0,8 % en tampon TBE où l'on a incorporé un agent intercalant (GelRedTM, Biotium, Hayward, CA, Etats-Unis).

2. Evaluation de la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les ADN extraits

La présence d'inhibiteurs de la PCR dans les ADN extraits a été évaluée en ajoutant 10 et 25 ng d'ADN à une quantité connue de plasmides pB10 (10⁵ copies.µL⁻¹). La qPCR ciblant pB10 a été réalisée en utilisant les amorces présentées dans le Tableau 11, avec une détection en SYBR Green sur le thermocycleur Bio-Rad MiQTM2 real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories). Les caractéristiques des réactions de PCR quantitative sont détaillées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Caractéristiques du mélange réactionnel et du programme de PCR quantitative.

Mélange réactionnel		Programme d'amplification			
Réactifs	Volume (µl)	Etapas	Durée	Température (°C)	Nombre de cycles
MESAFast q-PCR MasterMix for SYBR Assay (Eurogentec)	12.5	Dénaturation initiale	5 minutes	95	1
Amorce sens (5 µM)	0.5	Dénaturation	15 secondes	95	40
Amorce anti-sens (5 µM)	0.5	Hybridation & Elongation	1 minute	60	
H ₂ O	10.5	Elongation finale	5 minutes	72	1
ADNg (≈ 0.1-1 ng)	1	Courbe de fusion	10 secondes	60 à 95	71
Volume final	25				

a) Evaluation de la charge bactérienne totale des ADN extraits

La charge bactérienne totale des ADN métagénomiques a été estimée en amplifiant 1 ng des ADN extraits par les différentes méthodes avec les amorces panbactériennes ciblant le gène de l'ARNr 16S : Eub338F et Eub518R (Tableau 8). Une détection en SYBR Green sur le thermocycleur Bio-Rad MiQTM2 real-time PCR system a été utilisée. Les caractéristiques des réactions de PCR quantitative sont détaillées dans le Tableau 7.

Des courbes étalon de 6 points (de 10² à 10⁷ copies) ont été réalisées avec des dilutions successives des amplicons de 1500 pb de l'ADNr 16S de *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 obtenus avec les amorces 8F et 1525R (Tableau 8) selon le protocole décrit dans § III C 3 c. Les conditions de la PCR classique permettant d'obtenir les amplicons de 1500 pb de l'ADNr 16S sont présentées dans le Tableau 9. Il faut préciser que les amorces Eub, utilisées pour quantifier la charge bactérienne des ADN extraits des fèces, amplifient un fragment au sein de l'amplicon de 1500 pb.

Tableau 8. Amorces ciblant le gène de l'ADNr 16S.

Amorce	Séquence (5'→ 3')	Taille de l'amplicon (pb)	Positions*	Références
Eub₃₃₈^F Eub₅₁₈^R	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG ATT ACC GCG GCT GCT GG	196	338-357 535-518	Guo et al. 2008
8F 1525R	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	1500	8-27 1545-1525	Chen et al. 2000

* définies sur le gène de l'ARNr 16S de *E. coli* (n° d'accension CU928161).

Tableau 9. Caractéristiques du mélange réactionnel et du programme de PCR classique (thermocycleur Biometra T1).

Mélange réactionnel		Programme d'amplification			
Réactifs	Volume (µl)	Etapes	Durée	Température (°C)	Nombre de cycles
Tampon PCR 10X sans MgCl ₂	5	Dénaturation initiale	5 minutes	95	1
MgCl ₂ (50 mM)	2	Dénaturation	45 secondes	95	40
dNTP (10 mM)	1	Hybridation	45 secondes	55	
Amorce sens (50 µM)	1	Elongation	45 secondes	72	
Amorce anti-sens (50 µM)	1	Elongation finale	5 minutes	72	1
Taq DNA polymérase (5 U/µl, Invitrogen)	0.4				
H ₂ O pour biologie moléculaire qsp 50 µl	37.6				
ADNg (≈ 0.1-1 ng)	2				

b) Evaluation de la capacité de lyse de différents types de paroi bactérienne

Afin d'évaluer la capacité de chaque méthode d'extraction à lyser différents types de paroi bactérienne, des quantités calibrées de trois espèces bactériennes ont été inoculées à des échantillons de fèces et des échantillons de contenu intra-caecal. Les souches utilisées étaient les suivantes :

- *Prevotella baroniae* DSM 16972^T présentant une paroi fine de bactérie à Gram négatif,
- *Enterococcus faecium* BM 4339 présentant une paroi épaisse de bactérie à Gram positif,
- *Mycobacterium chelonae* CIP 104535^T présentant une paroi épaisse comportant des acides mycoliques.

Les souches ont été choisies car elles présentent trois structures de paroi différentes mais aussi parce qu'elles possèdent chacune une séquence chromosomique spécifique et monocopie (gène *nimI* pour *P. baroniae*, gène *vanD* pour *E. faecium* et séquence ITS pour *M. chelonae*).

Après inoculation du mélange bactérien aux échantillons de matériel fécal, l'ADN génomique a été extrait à l'aide des sept méthodes testées. Le nombre de copies de chaque séquence signature a ensuite été évalué par une approche de qPCR en utilisant le protocole et le mélange réactionnel qui sont décrits dans le Tableau 7. Les amorces utilisées en qPCR sont présentées dans le Tableau 10. Il est à noter que ces trois espèces bactériennes ne sont pas présentes au sein du microbiote intestinal natif de la souris. L'absence de séquences ITS, *nimI* et *vanD* a été vérifiée au préalable en qPCR sur des ADN extraits à partir de fèces de souris témoins.

Des gammes étalon de 6 points (de 10² à 10⁷ copies) ont été réalisées avec des dilutions successives des ADN génomiques de chacune des souches, selon le protocole décrit dans le paragraphe « Gammes étalon, contrôles positifs et contrôles négatifs ».

Tableau 10. Amorces ciblant ITS, *nimI* et *vanD*.

Amorce	Cible	Séquence (5' → 3')	Taille de l'amplicon (pb)	Référence
ITSf ITSr	ITS	GTT TCT GTA GTG GTT ACT CGC TT GAT AAG CCTC GGG GAG CTG	336	Ngan et al. 2011
Nim5f Nim5r	gène <i>nim</i>	CCT ACT TCC GCA GCG TCA TCG CCT TT GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC	457	Cette étude Trinh et al. 1996
VanD ₃ VanD ₄	gène <i>vanD</i>	TAA GGC GCT TGC ATA TAC CG TGC AGC CAA GTA TCC GGT AA	461	Perichon et al. 2000

3. Extraction d'ADN à partir de souches bactériennes pures

Les préparations d'ADN génomique bactérien ont été réalisées à partir de cultures sur milieux gélosés adaptés, avec le coffret QIAamp DNA mini kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. L'ADN extrait a été élué dans du tampon Tris-EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) et conservé à -20°C pour une utilisation différée, ou à 4°C pour une utilisation immédiate.

L'ADN plasmidique utilisé pour la quantification du pB10 par qPCR a été extrait selon le protocole de Birnboim & Doly (1979) à partir de la souche CM102 de *E. coli* préalablement cultivée à saturation en LB liquide, à 37°C, sous agitation (160 rpm). Les bactéries ont été collectées par centrifugation (1 minute à 10000g) à partir de 1,5 mL de culture. Le culot cellulaire a été mis en suspension dans 100 µL de tampon GTE (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH 8). Les cellules ont été lysées par ajout de 200 µL de NaOH/SDS (0,2 M NaOH, 1 % dodécylsulfate de sodium) et agitation douce (6 retournements du tube). Les débris protéiques ont alors été extraits par ajout de 150 µL d'acétate de potassium à 5 M, 200µL de phénol et 200µL de chloroforme, puis mélangés au vortex pendant 2 secondes. La phase phénolique a été séparée par centrifugation (vitesse 15000 g, 10 minutes) et la phase aqueuse a été transvasée dans un nouveau tube de 1,5 mL. Les ADN ont été précipités par ajout de 800 µL d'éthanol absolu et centrifugation (vitesse 15000g, 10 minutes). Le surnageant a été retiré et les culots ont été rincés avec 1 mL d'éthanol à 70 % suivi d'une nouvelle centrifugation (vitesse maximale 15000 g, 10 minutes). Finalement, le surnageant a été retiré et les culots ont été séchés avant d'être réhydratés avec 5 µL d'eau ultrapure.

4. Détection des souches bactériennes donneuses (DH5α et Δ*fli*) et du plasmide pB10 par qPCR

a) Détection de DH5α et de pB10 par qPCR

(1) Amorces et sondes utilisées

Les amorces et les sondes utilisées dans cette étude ont été élaborées par Bonot & Merlin (2010) et sont disponibles dans les Tableaux 11 et 12.

Le couple d'amorces Tn1-in et Tn1-out ainsi que la sonde Tn1 marquée en 5'-FAM et en 3'-TAMRA sont spécifiques d'une région tronquée du gène *tnpA* codant pour la transposase de l'*IS1071* spécifique du plasmide pB10. Le couple d'amorces DH5-in et DH5-out, ainsi que la sonde DH5 marquée sont spécifiques de la délétion Δ(*argF-lac*)U169 caractéristique de la souche de *E. coli* DH5α. Cette délétion correspond à la perte d'un fragment de 97239 pb entre les gènes *mmuP* et *mhpD* de la souche de *E. coli* K12. Les amorces et les sondes utilisées ont été synthétisées par Applied Biosystems (Foster City, CA, Etats-Unis).

Tableau 11. Sondes et amorces utilisées pour la détection de pB10 par qPCR

Nom	Séquence	Taille de l'amplicon
Amorces		
Tn1-in	5'- CAATACCGAAGAAAGCATGCG -3'	135 pb
Tn1-out	5'- AGATATGGGTATAGAACAGCCGTCC -3'	
Sondes		
Tn1	(FAM)5'-CCTCCACGGTGCGCGCTG-3'(TAMRA)	

Tableau 12. Sondes et amorces utilisées pour la détection de DH5α par qPCR

Nom	Séquence	Taille de l'amplicon
Amorces		
DH5-in	5'-ACCGGGTACATCATTTCC-3'	140 pb
DH5-out	5'-GCCCCGGTAAGAATGAT-3'	
Sondes		
Tn1	(FAM)5'-CCTCCACGGTGCGCGCTG-3'(TAMRA)	

(2) Conditions des PCR quantitatives ciblant pB10 et DH5α

La quantification par qPCR du nombre de copies du plasmide pB10 et de la souche donneuse *E. coli* DH5α au sein des échantillons fécaux a été réalisée selon le mélange réactionnel suivant :

- TaqMan® Universal PCRMaster Mix, NoAmpErase UNG (Applied Biosystems) : 12,5 µL;
- Amorce sens (10 µM): 2 µL;
- Amorce anti-sens (10 µM): 2 µL ;
- Sonde (10 µM): 0,5 µL;
- AND extrait (10 ng/µL): 2,5 µL ;
- Eau pour biologie moléculaire ADN/ARN-free (Applied biosystems) : qsp 25 µl.

Les réactions de qPCR ont été réalisées dans un thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems) en barrettes de tubes. Les cycles d'amplification ont été les suivants : un cycle de 10 minutes à 95°C suivi de 45 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

Chaque échantillon a été testé en duplicat. Pour chaque qPCR, des gammes étalon de 7 points (10^6 à 10^0 copies) ont été réalisées en duplicat à partir d'ADN pur plasmidique et d'ADN chromosomique selon le protocole détaillé en §IIIC3c.

b) Mise au point de la qPCR pour la détection de *E. coli* Δfli

(1) Recherche de séquences spécifiques

La recherche de zones spécifiques sur un fragment de séquence de *E. coli* Δfli de 2865 nucléotides, dont nous disposons, a été réalisée par comparaison de cette séquence à celles contenues dans les bases de données nucléotidiques « nr/nt » (*Non redundant nucleotides collections*) à l'aide du logiciel en ligne BlastN («Basic Local Alignment Search Tool», NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

(2) Développement d'amorces et de sondes spécifiques pour *E. coli* Δfli

Les amorces et les sondes FAM - TAMRA spécifiques de *E. coli* Δfli ont été élaborées avec les logiciels FastPCR ((Kalendar et al. 2011) et PrimerBLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Les couples ont été sélectionnés manuellement par localisation sur la séquence. Ils devaient répondre aux caractéristiques optimales des sondes et des amorces, définies par le cahier des charges Applied Biosystem et *PrimeTime qPCR application guide* (IDTDNA.com).

Ainsi pour les amorces, les paramètres requis étaient :

- une longueur optimale de 22 nucléotides (18-30 bases),
- une température de fusion comprise entre 60-64°C,
- un pourcentage en bases G et C compris entre 35-65%.

Les sondes ADN correspondantes à chaque couple devaient remplir les exigences suivantes :

- un pourcentage en bases G et C compris entre 35 et 65%,
- l'absence de base G à l'extrémité 5' de la sonde (pour éviter la suppression de fluorescence du fluorophore FAM en 5'),
- une température de fusion comprise entre 66 et 70°C,
- une taille la plus petite possible mais supérieure à 15 nucléotides (20-28 bases).

La qualité des sondes et des amorces a été vérifiée *in silico* pour s'assurer de l'absence de formation de dimères. La spécificité a été testée à l'aide du logiciel BLAST « Basic Local Alignment Search Tool » (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Les amorces et les sondes FAM/TAMRA (Tableau 13) ont été synthétisées par Eurogentec (Eurogentec, Angers, France).

Tableau 13. Sondes et amorces utilisées pour la détection de Δfli par qPCR.

Nom	Séquence	Taille de l'amplicon
Amorces		
fli5_F	5'-TGTTGCGATATGTGAGTGAGCTT-3'	205 pb
fli5_R	5'-ATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCA-3'	
fli3_F	5'-AAGGCGACAAGGTGCTG-3'	197 pb
fli3_R	5'-TTGAGTGAGTTTGCCCAT-3'	
Sondes		
S_fli5	(FAM)5'-AACGTTACGGAACCTGTGACGGAA-3'(TAMRA)	
S_fli3	(FAM)5'-CGATTCAGGTTTCATCATGCCGTCTGT-3'(TAMRA)	

(3) Conditions de qPCR ciblant *E. coli* Δfli

Pour des questions organisationnelles, les réactions de qPCR pour la souche donneuse *E. coli* Δfli ont dû être réalisées en utilisant le thermocycleur Bio-Rad MiQ™2 real-time PCR system (et non pas StepOne, Applied Biosystem, comme pour pB10 et DH5). Le mélange réactionnel suivant a été utilisé :

- qPCR MasterMix NO ROX 2x (Eurogentec) : 12,5 μ L ;
- Amorce sens (10 μ M): 1.5 μ L ;
- Amorce anti-sens (10 μ M): 1.5 μ L ;
- Sonde (10 μ M): 0,75 μ L ;
- AND extrait (10 ng/ μ L): 2,5 μ L ;
- Eau pour biologie moléculaire ADN/ARN-free (Applied biosystems) : qsp 25 μ L.

Les cycles d'amplification ont été les suivants : un cycle de 10 minutes à 95°C suivi de 45 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

Les réactions ont été réalisées en duplicat. Pour chaque qPCR, des gammes étalon de 7 (10^6 à 1 copies) ont été réalisées en duplicat à partir d'ADN chromosomique selon le protocole détaillé en § III C 3 c.

(4) Conditions de la PCR en point final ciblant *E. coli* Δfli

Lors des mises au point de la détection de *E. coli* Δfli , les réactions de PCR « classique » ont été réalisées dans un volume final de 25 μ L contenant 200 μ M de chaque dNTP, 0,8 μ M de chaque amorce, 1,5 unités d'ADN polymérase (Invitrogen, Carlsbad, CA, Etats-Unis), 3 mM de MgCl₂ et 1x de tampon de réaction. Les cycles de PCR, réalisées sur le thermocycleur Biometra T1 (Göttingen, Allemagne), ont consisté en une étape initiale de dénaturation de 5 minutes à 95°C, suivie de 30 cycles d'amplification (dénaturation à 94°C pendant 30 sec, hybridation à 60°C pendant 30 sec, élongation à 72°C pendant 30 sec) et d'une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en tampon TBE.

c) Gammes étalon, contrôles négatifs et contrôles d'inhibition

Des gammes étalon allant de 10^7 à 10^2 ou 10^1 copies de différentes séquences cibles (ADNr 16S, *nimI*, *vanD*, ITS, pB10, DH5 α et Δfli) ont été réalisées en duplicat pour chaque

qPCR afin de valider l'efficacité, le seuil de détection, les seuils de quantification des qPCR, et pour quantifier l'abondance relative de ces séquences dans les échantillons analysés. Les courbes étalons ont été réalisées avec des dilutions successives d'un facteur 10 des ADN extraits des souches porteuses de séquences cibles (Tableau 5). Pour l'ADNr16S, les amplicons de 1500 pb du gène *rrn16S* ont servi à établir la gamme.

Le nombre de copies des gènes cibles a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\frac{(NA \times [ADN])}{[(\text{taille du génome, du plasmide ou de l'amplicon}) \times 660]} = \text{nombre de copies du gène cible / ml}$$

où :

- NA correspond au nombre d'Avogadro ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) ;
- [ADN] correspond à la concentration d'ADN (en g.ml^{-1}) ;
- la taille du génome (ou de l'amplicon) est exprimée en paires de bases (Tableau 14) ;
- la masse d'une paire de bases est égale à $2 \times (330 \text{ g.mol}^{-1})$.

Tableau 14. Tailles des génomes utilisées pour établir les gammes étalon.

Souche/plasmide	Taille (Mb)
pB10	0,0645
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	4,52
<i>Escherichia coli</i> MG1655 Δfli	~ 4,64
<i>Prevotella baroniae</i>	3,30
<i>Mycobacterium chelonae</i>	2,26
<i>Enterococcus faecium</i>	2,90

Deux témoins négatifs ont systématiquement été réalisés pour chaque PCR. Ils consistaient en un ajout d'eau ultra-pure à la place d'ADN matrice. Pour les qPCR ciblant pB10, DH5 α et Δfli , les contrôles d'inhibition ont été réalisés au hasard sur deux échantillons à chaque plaque de qPCR réalisée. Ils consistaient à ajouter une concentration connue d'ADN de pB10, de DH5 α ou de Δfli , et à vérifier ensuite la correspondance de la concentration d'ADN cible détectée en PCR.

D. Cytométrie en flux

1. Préparation des échantillons

Le protocole de préparation du surnageant de fèces a été choisi d'après une analyse bibliographique (Tableau 15). On obtient avec ce protocole des surnageants de fèces de qualité reproductible et représentatifs de la population cellulaire fécale (van der Waaij et al. 1994, Zoetendal et al. 2002).

Tableau 15. Protocoles de préparation des surnageants de fèces pour l'analyse en CMF

Protocole	Référence
fèces humaines, 0,5 g + PBS 4,5 ml; vortex 3 min. avec 5-10 billes (3 mm); centrifugation 700 g 1 min → récupération 1 mL de surnageant	Ben-Amor et al. 2005
fèces humaines, 0,5 g + PBS 4,5 ml; vortex 5 min. avec 5-10 billes (3 mm); centrifugation 700 g 1 min → récupération 1 mL de surnageant	Zoetendal et al. 2002
fèces des rats 0,5 g + PBS ; vortex ; centrifugation 200 g 2 min → récupération 50 µL de surnageant	Bahl et al. 2007
fèces humaines, 0,5 g + PBS 4,5 ml; vortex 5 min; centrifugation 35 g 20 min → récupération 20µL de surnageant	van der Waaij et al. 1994

Les échantillons de fèces ont été analysés immédiatement après leur collecte ou après une période de 14 jours de congélation à -20°C (spécifié dans les résultats).

Pour extraire les cellules bactériennes, 250 mg de fèces ont été suspendus dans 4,5 mL de PBS filtré à 0,2 µm. L'ensemble a été homogénéisé au vortex pendant 1 minute en présence de 5 billes de verre stériles de 5 mm de diamètre. Après une centrifugation à 700g pendant 1 minute, 1 mL de surnageant a été récupéré.

Pour fixer la dilution optimale des surnageants de fèces, plusieurs approches ont été envisagées :

- un ajustement de la dilution à partir des mesures de la densité optique (DO). Cette approche donnait des résultats variables, probablement à cause des particules non biologiques contenues dans les fèces qui faussaient les mesures de la DO.
- un ajustement par rapport au débit d'évènements enregistré par le cytomètre (optimum de 200-1000 évènements/sec, maximum 4000). Cette approche donnait des résultats fiables.

Grâce à cette approche, nous avons constaté que la concentration des surnageants était peu variable d'un échantillon à l'autre. Ainsi une dilution systématique des surnageants de fèces (d'un facteur 100 pour l'analyse des évènements fluorescents et d'un facteur 1000 pour l'analyse des évènements totaux) donnaient des débits cellulaires attendus. Les dilutions systématiques des surnageants au 1/100^{ème} (protocole 2) et 1/1000^{ème} (protocole 1) ont donc été retenues.

Immédiatement avant chaque acquisition en cytométrie, les échantillons ont été vortexés pendant 15 secondes.

2. Analyse des échantillons par cytométrie en flux

Un cytomètre FACS-Calibur (Becton Dickinson) avec un laser argon de 15 mW et de longueur d'onde d'excitation de 488 nm a été utilisé pour les analyses. Pour la détection de la fluorescence verte, un filtre de bande passante 530 +/-30 nm (FL1) a été appliqué. Les voltages des photodétecteurs ont été réglés à :

- E01 pour FSC (forward scatter, reflétant la taille relative des particules),
- 300 mV pour SSC (side scatter ou granulométrie relative),
- 400 mV pour le détecteur FL1 (fluorescence verte).

Tous les paramètres ont été mesurés en utilisant une amplification logarithmique. Pour limiter le bruit de fond, des seuils d'acquisition ont été fixés à 45 (SSC) et 240 (FL1). Les données ont été analysées avec le logiciel CellQuest (Becton Dickinson). Pour représenter les événements totaux et fluorescents, des histogrammes mono-paramétriques SSC et FL1 ont été combinés à un histogramme bi-paramétrique (SSC vs FL1).

L'acquisition des événements a été effectuée en deux temps :

- l'acquisition des événements totaux (protocole 1) a été effectuée pendant 120 secondes avec un débit théorique faible (environ 12 $\mu\text{L}/\text{min}$).
- l'acquisition des événements fluorescents (protocole 2) s'est déroulée pendant 900 secondes avec un débit théorique élevé (environ 50-60 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Le volume d'échantillon utilisé pour chaque acquisition a été calculé en mesurant la différence de masse de l'échantillon avant et après l'acquisition.

Le marquage des cellules des surnageants de fèces a été effectué pour vérifier la cohérence des énumérations des événements cellulaires totaux. Ceci a été réalisé sur des surnageants de fèces dilués jusqu'à environ 10^5 cellules/mL. Chaque échantillon de 1 mL a été marqué pendant 15 minutes à l'obscurité avec 0,5 μL de SYBR green II (à 10000X), un marqueur fluorescent des acides nucléiques. L'ensemble des échantillons marqués a été analysé par cytométrie en flux. Le cytomètre a été paramétré pour une acquisition en SSC avec une mesure de fluorescence en FL1 (fluorescence verte, longueur d'onde 515 à 545 nm) sans seuillage. Le gain octroyé au photomultiplicateur FL1 était alors de 540 mV et de 350 mV pour SSC.

Le cas échéant, pour la détection cytométrique de cellules marquées à la rfp (fluorescence rouge), des filtres de bande passante : 585 ± 20 nm (FL2) et 610 ± 20 nm (FL3) a été appliqué. Les gains de photomultiplicateurs ont été réglés comme suit : SSC 385 mV, FL1 520 mV, FL2 500 mV.

E. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Minitab ® 16.2.3 Statistical Software. Pour l'analyse, les résultats de qPCR ont été transformés en logarithmes décimaux. Les données ont été exprimées comme moyennes $\pm$ erreur type de la moyenne. La normalité des données a été testée en utilisant le test d'Anderson Darling. Les comparaisons multiples ont été conduites en utilisant le test ANOVA avec la correction de Welch (qui n'exige pas que les déviations standard des données comparées soient identiques). Un test post-hoc de Tukey-Kramer a ensuite été réalisé pour identifier les groupes significativement différents. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque p était inférieur à 0,05.

IV. Résultats

Ce travail s'inscrit dans un projet de l'Equipe d'Accueil 7300 'Stress Immunité Pathogènes' de l'Université de Lorraine. Il vise à étudier le transfert de gènes au sein du microbiote intestinal.

L'étude du transfert de gènes en conditions environnementales est relativement complexe. L'étudier *in vivo* au niveau du microbiote intestinal ajoute un degré de difficulté à l'expérimentation.

Dans ce contexte, une première partie de ce travail a consisté à définir les conditions expérimentales *ad hoc* pour étudier le transfert d'un plasmide modèle dans le microbiote intestinal murin. Dans une deuxième partie, des expérimentations ont porté sur l'évaluation de deux approches (qPCR et CMF) pour détecter le plasmide d'intérêt ainsi que la bactérie donneuse dans les fèces après son inoculation orale.

A. Bactéries vectrices des plasmides

Des souches bactériennes donneuses ont été élaborées par conjugaison sur milieux solides. Après purification sur milieux sélectifs, les transconjugants obtenus ont été analysés.

Un des transconjugants, CM363, issu de la conjugaison de *C. necator* (pB10::mini-Tn5gfp1) et de *E. coli* DH5 α , présentait les caractéristiques suivantes :

- son génome portait à la fois les séquences spécifiques de DH5 α et de pB10 amplifiables par PCR,
- une fluorescence verte était observée en microscopie à fluorescence (Figure 23).

Le transconjugant CM363 a donc été retenu pour la suite de cette étude.

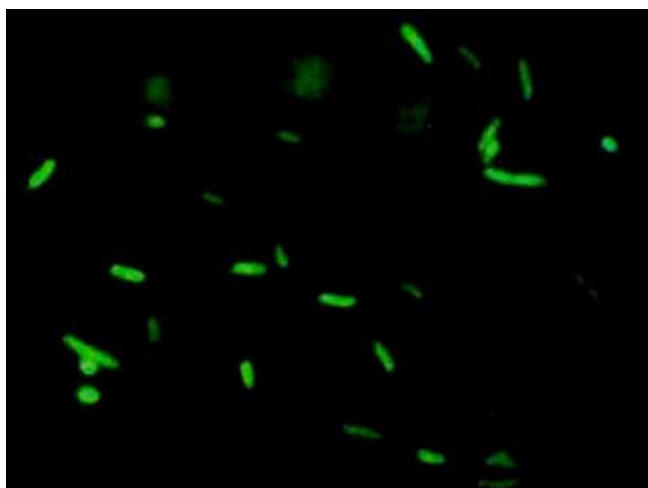


Figure 23. Expression de la GFP chez *Escherichia coli* DH5 α (pB10::mini-Tn5gfp1). Bactéries observées en microscopie à épifluorescence (x1000).

Un des transconjugants, LBM13, issu de la conjugaison de *E.coli* Δ fli et de *E. coli*(pB10::rfp) (CM 275), présentait les caractéristiques suivantes :

- son génome portait à la fois une séquence spécifique de pB10 et de Δ fli,
- après 48-72 heures d'incubation, les colonies formées sur milieu LB gélosé présentaient une coloration rosée caractéristique de la production de RFP (Figure 24),

- les cellules observées au microscope à épifluorescence présentaient une fluorescence orangée qui suggère un double marquage vert-rouge (Figure 25).

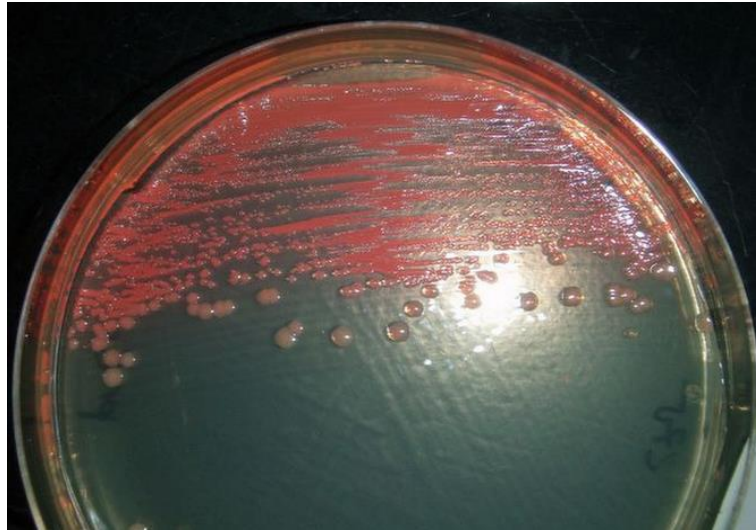


Figure 24. Aspect des colonies de *E. coli* Δfli (pB10::rfp) sur milieu gélosé.

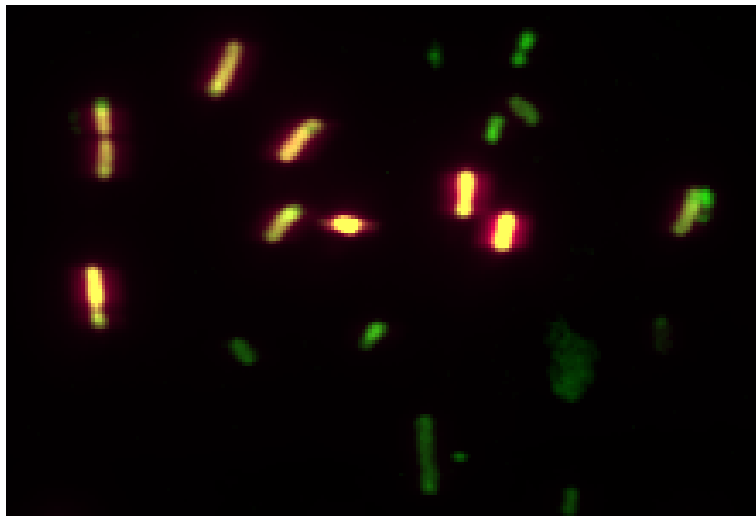


Figure 25. Double fluorescence de *E. coli* Δfli (pB10::rfp) (LBM13).
Bactéries observées en microscopie à épifluorescence (x1000).

L'utilisation de cette souche pour la détection de TGH en cytométrie en flux pouvait donc être envisagée. Une mise au point de sa détection par qPCR a également été nécessaire.

B. Suivi du plasmide pB10 et de ses souches donneuses par qPCR dans les fèces murines

1. Sélection d'une méthode d'extraction et de purification d'ADN total à partir de fèces murines

L'extraction d'ADN est une étape clé dans les approches basées sur la biologie moléculaire. Elle garantit la qualité optimale de l'ADN pour une utilisation en PCR. Il s'agit, en général, d'obtenir un ADN en concentration importante, faiblement altéré par les étapes d'extraction et de purification, et contenant peu de contaminants susceptibles d'inhiber la réaction d'amplification par PCR.

Cependant, aucune étude comparative de méthodes d'extraction n'a jusque-là été effectuée sur du matériel fécal murin. Pourtant, les modèles murins sont fréquemment utilisés en recherche expérimentale, notamment dans les études comparatives de la flore intestinale, puisqu'ils permettent de s'affranchir de certains biais. Ces modèles se caractérisent en effet par :

- une faible variabilité interindividuelle de la flore intestinale (contrairement à la flore humaine) (Thompson et al. 2010),
- un contrôle aisé du génotype, des paramètres environnementaux et du régime alimentaire (Turnbaugh et al. 2006),
- une extrapolation plus aisée des résultats (souris « humanisées » hébergeant une flore proche du microbiote humain) (Gootenberg & Turnbaugh 2011).

Dans ce contexte, sept techniques d'extraction ont été testées afin d'identifier une méthode garantissant l'obtention d'ADN de fèces et de contenus intestinaux murins utilisables en PCR.

Pour ce faire, l'ADN total a été extrait par les sept techniques (énumérées dans le Tableau 6) à partir d'un pool de fèces d'une souris collectées pendant 4 jours et congelées à – 20 °C. Ces techniques ont également été appliquées à un pool de contenus caecaux issus de 2 souris. Ce pool a été congelé à – 80 °C immédiatement après prélèvement.

Les fabricants recommandent différentes quantités de matière initiale. Nous avons donc testé, lors des essais préliminaires, des échantillons de 50, 100, 150 et 200 mg. Pour des échantillons de 100 mg ou plus, l'ADN obtenu par plusieurs techniques était de mauvaise qualité, ce qui est probablement dû à la surcharge du système de purification (e. g. colonne de silice). C'est pourquoi nous avons finalement évalué l'ensemble de techniques sur des échantillons de 50 mg.

La qualité des méthodes d'extraction a été analysée selon cinq critères :

- le rendement de l'extraction en termes de concentration d'ADN,
- la présence de contaminants co-extraits,
- l'intégrité des acides nucléiques obtenus,
- la charge bactérienne totale contenue dans les ADN extraits,
- la capacité de lyse de différents types de paroi bactérienne par les techniques testées.

a) Rendement d'extraction

(1) Comparaison des techniques d'analyse des rendements

La concentration d'ADN extrait a été analysée à l'aide d'une méthode spectrophotométrique et d'une méthode fluorimétrique. Dans un premier temps, nous avons comparé ces deux techniques, afin de choisir celle qui garantit une évaluation optimale des rendements.

En effet, la mesure spectrophotométrique, technique la plus répandue, est basée sur la détermination de l'absorbance à 260 nm (A260). Or, cette longueur d'onde n'est pas spécifique uniquement de l'ADN double brin, mais également des acides nucléiques simple brin (ADN et ARN) et des nucléotides, contaminants fréquents des ADN extraits.

La méthode fluorimétrique, utilisant un agent intercalant fluorescent spécifique de l'ADN double brin, permet de s'affranchir de ces problèmes, rendant les mesures des rendements d'extraction beaucoup plus fiables.

La comparaison des résultats des rendements obtenus avec les deux techniques lors de cette étude a confirmé ces biais, comme l'illustre le Tableau 16. Effectivement, la spectrophotométrie surévaluait les concentrations de l'ADN total. Les rendements ont donc été calculés à partir des dosages fluorimétriques.

Tableau 16. Comparaison des techniques fluorimétriques et spectrophotométriques.

Abréviation	Rendement ADN ($\mu\text{g/g} \pm \text{SEM}$) - technique fluorimétrique Qubit	Rendement ADN ($\mu\text{g/g} \pm \text{SEM}$) – spectrophotométrie Nanodrop	Rapport de rendements
Fèces			
QS	35,47 $\pm$ 1,39	172,42 $\pm$ 15,70	4,86
FpS	58,02 $\pm$ 7,60	129,89 $\pm$ 6,18	2,24
FpF	63,69 $\pm$ 5,13	96,03 $\pm$ 7,34	1,51
EM	19,66 $\pm$ 9,54	171,95 $\pm$ 86,20	8,75
ZR	64,20 $\pm$ 24,20	99,34 $\pm$ 44,20	1,55
MG+PH	25,90 $\pm$ 10,70	217,55 $\pm$ 25,00	8,40
BO	134,00 $\pm$ 15,80	318,74 $\pm$ 87,70	2,38
Contenus intestinaux			
QS	5,09 $\pm$ 0,96	20,97 $\pm$ 3,61	4,12
FpS	74,55 $\pm$ 1,59	151,34 $\pm$ 13,10	2,03
FpF	36,64 $\pm$ 8,63	40,87 $\pm$ 4,39	1,12
EM	7,83 $\pm$ 1,95	41,70 $\pm$ 11,90	5,33
ZR	7,04 $\pm$ 5,11	27,05 $\pm$ 15,90	3,84
MG+PH	6,83 $\pm$ 1,46	31,62 $\pm$ 1,69	4,63
BO	6,34 $\pm$ 2,37	16,98 $\pm$ 3,90	2,68

(2) Analyse des rendements

Les mesures fluorimétriques ont montré des variations importantes en termes de rendement avec des concentrations d'ADN extraits, variant de 19,7 à 134 $\mu\text{g/g}$ pour les fèces et de 5 à 74 $\mu\text{g/g}$ pour les contenus intra-caeaux (Tableaux 17, 18).

Pour les extractions à partir des fèces, le protocole de Bonot et al. (2010) (BO), combinant la lyse mécanique par ultrasons à la lyse chimique, a permis le plus fort rendement de 134 µg/g. Ce rendement a été significativement supérieur à ceux obtenus avec les autres méthodes ($p = 0,001$), sauf pour la trousse ZR Fecal (ZR) dont les rendements ont été trop aléatoires pour être comparés.

Les méthodes utilisant la lyse mécanique par agitation avec des billes (ZR, FpS, FpF), ont permis d'obtenir de bons rendements allant de 58 à 64 µg/g de fèces (Tableau 17). Il est à noter toutefois que ZR donne des résultats variables d'un échantillon à l'autre (Tableau 17).

Les méthodes d'extraction chimique (QS, EM, MG+) ont eu des rendements plus faibles (19 à 35 µg/g).

Tableau 17. Résultats des extractions d'ADN des fèces avec les sept méthodes testées.

Abréviation	Méthode	Rendement ADN (µg/g fèces±SEM)	Rapport DO 260/280 (±SEM)	Charge bactérienne (log n copies rrn 16S/g fèces ±SEM)
QS	QuiAmp Stool	35,47 ± 1,39	2,10 ± 0,01	11,15 ± 0,02
FpS	FastDNA soil	58,02 ± 7,60	1,92 ± 0,02	11,97 ± 0,04
FpF	FastDNA feces	63,69 ± 5,13	2,23 ± 0,03	11,81 ± 0,04
EM	EasyMag	19,66 ± 9,54	1,99 ± 0,02	10,75 ± 0,24
ZR	ZR fecal	64,20 ± 24,20	1,60 ± 0,54	11,41 ± 0,38
MG+PH	Master G+	25,90 ± 10,70	1,62 ± 0,05	10,64 ± 0,15
BO	Bonot	134,00 ± 15,80	1,93 ± 0,03	12,02 ± 0,10

En ce qui concerne les extractions réalisées à partir des contenus intra-caecaux, FpS a été significativement plus performante que toutes les autres méthodes ($p < 0,001$), avec un rendement de 74,5 µg/g. FpF a permis un rendement deux fois plus faible (36,6 µg/g). Toutes les autres méthodes ont eu un rendement médiocre, variant de 5 à 7,8 µg/g (QS, BO, MG+, EM, ZR – Tableau 18).

Tableau 18. Résultats des extractions d'ADN des contenus caecaux avec les méthodes testées.

Abréviation	Méthode	Rendement ADN (µg/g contenus±SEM)	Rapport DO 260/280 (±SEM)	Charge bactérienne (log n copies rrn 16S/g contenus±SEM)
QS	QuiAmp Stool	5,09 ± 0,96	2,16 ± 0,05	10,30 ± 0,13
FpS	FastDNA Soil	74,55 ± 1,59	1,94 ± 0,01	11,94 ± 0,06
FpF	FastDNA Feces	36,64 ± 8,63	2,98 ± 0,14	11,30 ± 0,02
EM	EasyMag	7,83 ± 1,95	1,93 ± 0,01	10,83 ± 0,11
ZR	ZR fecal	7,04 ± 5,11	1,23 ± 0,58	10,73 ± 0,17
MG+PH	Master G+	6,83 ± 1,46	1,95 ± 0,04	10,54 ± 0,07
BO	Bonot	6,34 ± 2,37	1,79 ± 0,10	10,75 ± 0,23

b) Pureté des ADN extraits et présence d'inhibiteurs

La pureté des ADN extraits a été évaluée par le rapport d'absorbances A260/A280. Nous avons constaté une variabilité importante des niveaux de contaminations. Pour les fèces, un rapport compris entre 1,8 et 2 (indiquant une bonne pureté) a été obtenu avec les méthodes

FpS, EM et BO (Tableau 17). Pour les trousse MG+ et ZR, le rapport était inférieur à 1,8, signifiant une contamination probable par des protéines ou du phénol. De plus, la pureté des ADN extraits avec la trousse ZR était aussi la plus variable. Les méthodes QS et FpF donnaient des extraits avec un rapport dépassant 2, ce qui peut indiquer une contamination par des ARN.

Si les mesures de pureté des ADN peuvent donner des indications sur le niveau de contamination et éventuellement sur un risque d'inhibition des réactions de PCR, un test d'amplification par PCR était nécessaire pour le vérifier.

En effet, les milieux complexes, tels que les prélèvements intestinaux, peuvent contenir des fortes quantités de substances diminuant l'efficacité de la Taq polymérase (sels biliaires, protéines, polysaccharides, composés aromatiques). La présence éventuelle de ces inhibiteurs a été déterminée par PCR en temps réel en ajoutant une même quantité du plasmide pB10 aux échantillons d'ADN extraits par les 7 méthodes testées. Les amplifications de pB10 ont été effectuées en présence de 10 et 25 ng d'ADN issu du matériel fécal. Ces quantités correspondent aux conditions standard de PCR quantitative adoptées dans les protocoles de détection de la souche donneuse et de son plasmide (cf. chapitre « Matériel et méthodes »).

En présence d'inhibiteurs de PCR, on observe une augmentation du seuil de détection (Ct) du plasmide pB10. Nous n'avons observé aucune inhibition pour des échantillons de 10 ng d'ADN total (moins de 2% d'augmentation de seuil de détection). En augmentant la quantité d'ADN extrait de fèces, on augmente en parallèle la quantité d'éventuels inhibiteurs co-extraits. Dans notre étude, l'analyse des amplifications avec des échantillons de 25 ng d'ADN total a montré une inhibition partielle de l'amplification du pB10 pour les extraits obtenus avec la méthode MG+ (13 – 90 % d'inhibition).

En conclusion, nous avons exclu la possibilité de faux négatifs partiels ou totaux dus aux inhibiteurs pour 6 des 7 méthodes testées, du moins dans les limites des quantités d'ADN totaux testées.

c) L'intégrité des ADN

L'intégrité de l'ADN extrait est un paramètre important pour sa bonne amplificabilité. Elle a été évaluée à partir des profils électrophorétiques obtenus sur gel d'agarose à 0,8% (Figure 26). Un ADN intègre et de bonne qualité migre peu dans le gel alors qu'un ADN ayant subi de nombreuses cassures lors de l'extraction migre plus loin ou apparaît sous forme de « traînée ».

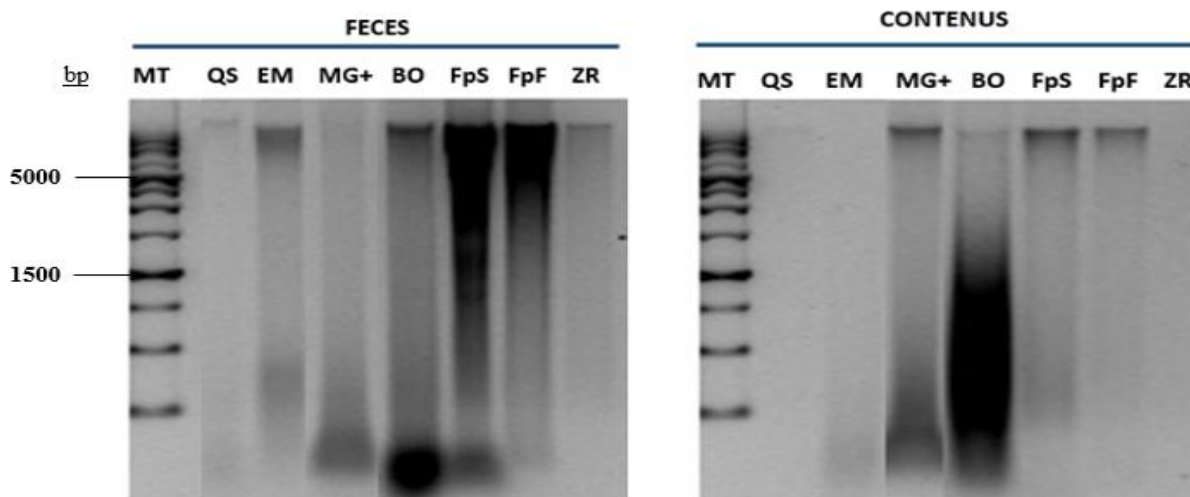


Figure 26. Intégrité des ADN extraits avec les sept méthodes testées.

Concernant les extractions d'ADN à partir des échantillons de fèces, on a constaté que 5 des 7 méthodes (FpS, FpF, EM, ZR, QS) testées ont permis d'obtenir des ADN peu altérés par l'extraction (fragments de plus de 5 kb). Les ADN extraits par les méthodes BO et MG+ présentaient une dégradation partielle (fragments de moins de 1 kb).

Pour les ADN extraits des contenus caeaux, seules les troussees FpS et FpF ont permis de conserver l'intégrité de l'ADN extrait. Avec la méthode MG+, la dégradation a été partielle. Le protocole BO causait une forte fragmentation de l'ADN extrait. Enfin, les quantités d'ADN obtenues avec les protocoles QS, EM et ZR ont été trop faibles pour être visualisées (Figure 26).

d) Charge bactérienne totale

Le critère important d'évaluation des méthodes d'extraction est la quantité de génomes bactériens présents dans l'ADN total extrait, rendant compte de la représentativité de la population bactérienne issue du matériel fécal. Elle a été estimée dans notre étude par la quantification du nombre de copies de l'ADNr 16S.

Les résultats de qPCR sont représentés dans la Figure 27 et les Tableaux 17 et 18. Pour les fèces, le nombre de copies du gène *rrn16S* était significativement plus élevé ($p < 0,001$) pour les méthodes utilisant la lyse mécanique avec des billes (FpS et FpF) et le protocole de Bonot et al. (2010). Les quantités obtenues par les méthodes utilisant uniquement la lyse chimique (QS, EM, MG+) étaient environ 10 fois moindres. Le rendement de la méthode ZR était trop aléatoire pour être comparé.

En ce qui concerne les contenus caeaux, la méthode FpS était significativement plus efficace ($p < 0,001$) que les autres méthodes.

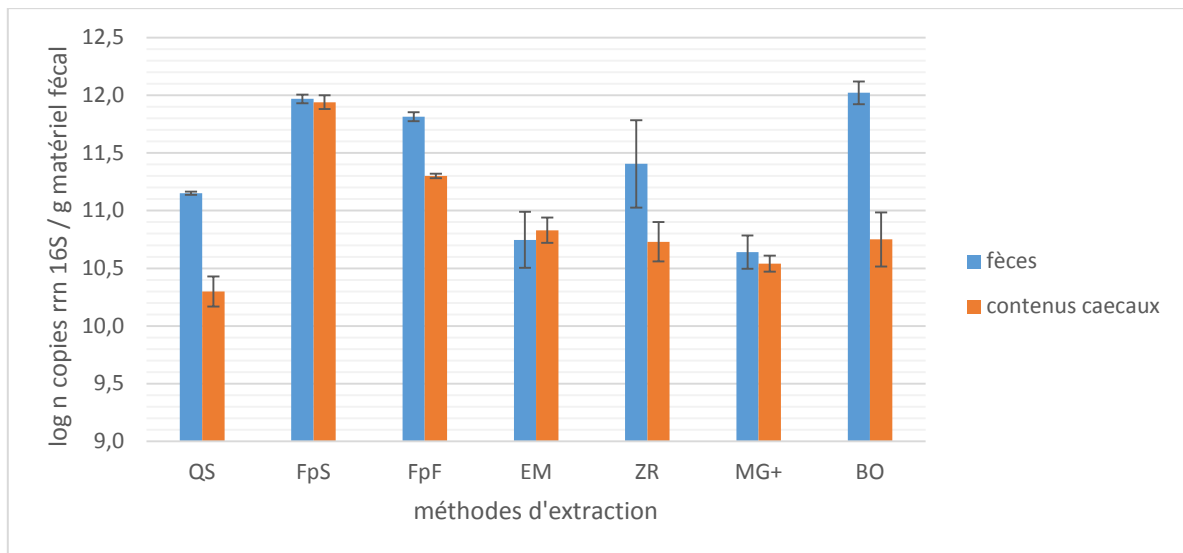


Figure 27. Charge bactérienne des ADN extraits par différentes méthodes testées.

e) Capacité de lyse des parois bactériennes

Le dernier critère évalué était la capacité de chaque méthode à lyser des parois bactériennes d'épaisseur et de constitution différentes. La nature de la paroi peut en effet influencer les rendements d'extraction d'ADN. Cette capacité a été jugée d'après les résultats obtenus pour trois espèces « modèles » :

- *P. baroniae* (paroi fine des bactéries à Gram négatif),
- *E. faecium* (paroi épaisse des bactéries à Gram positif),
- *M. chelonae* (paroi contenant des acides mycoliques).

Les Figures 28 et 29 présentent les résultats de détection de gènes spécifiques de ces trois espèces « modèles » après extraction d'échantillons de fèces et de contenus intra-caecaux inoculés avec 10^9 UFC de *P. baroniae* DSMZ 16972^T, 10^8 *E. faecium* BM 4339, 10^7 *M. chelonae* CIP 104535^T (inocula vérifiés par numération sur gélose).

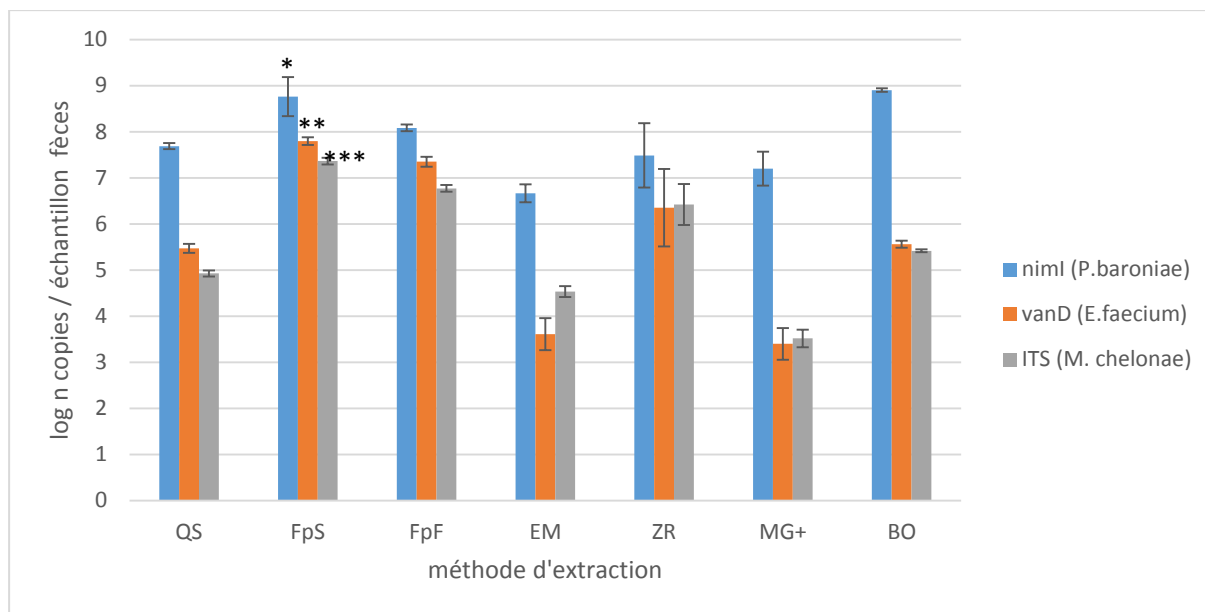


Figure 28. Nombre de copies de *nimI*, *vanD* et ITS détecté dans les fèces.
($p < 0,001$: * FpS vs EM ; ** FpS vs MG+, EM, QS, BO ; *** FpS vs QS, FpF, EM, MG+, BO)

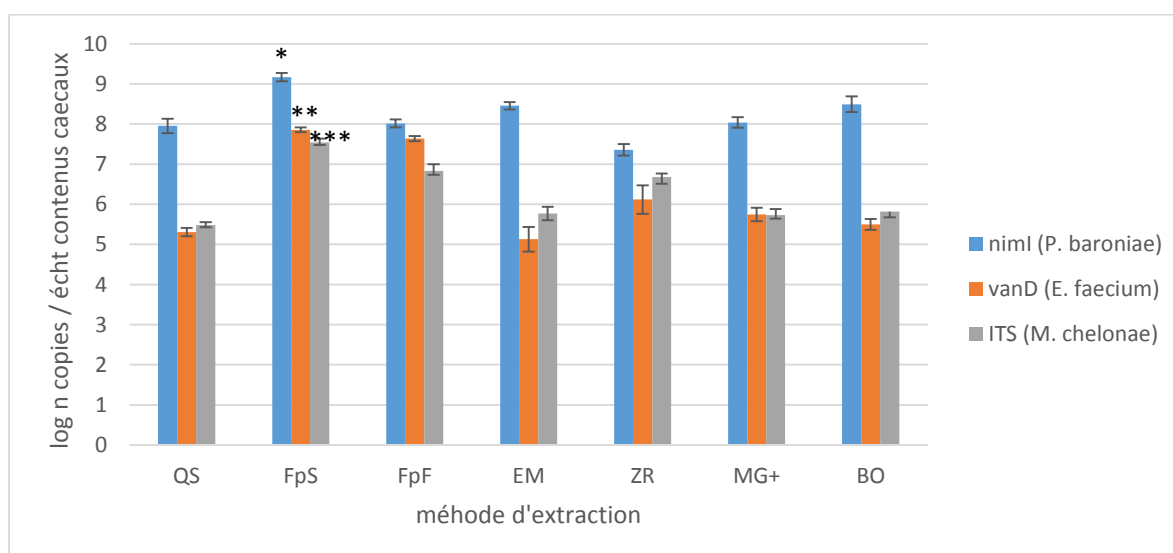


Figure 29. Nombre de copies de *nimI*, *vanD* et ITS détecté dans les contenus intestinaux.
($p < 0,001$: * FpS vs: QS, FpF, EM, ZR, MG+; ** FpS vs QS, EM, ZR, MG+, BO; *** FpS vs QS, FpF, EM, ZR, MG+, BO)

Une seule méthode (FpS) a permis d'obtenir des rendements d'extraction proches de 100%. Avec les autres méthodes des rendements d'extraction plus faibles ont été observés, en particulier pour *E. faecium* et *M. chelonae* (rendements d'extraction variant de 44% à 94%).

Au total, nous avons montré que la méthode FastDNA for Soil était la seule, parmi les méthodes testées, qui permettait d'obtenir une quantité d'ADN total importante avec un rendement d'extraction de l'ADN cible proche de 100%, une excellente qualité de l'ADN extrait, et ce, quelle que soit la nature de la paroi bactérienne. Cette technique a donc été retenue dans la suite de ce travail.

2. Suivi de pB10 ::mini-Tn-gfp1 et de *E. coli* DH5 α par qPCR

a) Validation de la technique d'analyse

Avant d'appliquer l'approche moléculaire au microbiome intestinal, il était nécessaire de s'assurer de la spécificité des amorces/sondes utilisées pour la PCR quantitative.

Pour cela, nous avons testé vingt échantillons de fèces de souris non inoculées. L'ADN total a été extrait avec la méthode d'extraction « FastPrep Soil ». Des réactions de qPCR ciblant le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp1* ainsi que le chromosome de son hôte DH5 α CM363 ont été effectuées en duplicats. Aucune amplification n'a été constatée dans les échantillons issus de souris non inoculées. Ces résultats montrent une bonne spécificité des amorces utilisées.

La sensibilité de détection de *E. coli* DH5 α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*), après extraction de fèces préalablement inoculés *in vitro* (gamme décroissante de 8.10^9 bactéries/50 mg à 8.10^1 bactéries/50 mg) avec cette souche, a été évaluée. Le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp1* et le chromosome de son hôte DH5 α ont été quantifiés par qPCR. Les nombres de copies de pB10::mini-Tn5-*gfp1* et de DH5 α attendus dans les extraits ont été calculés en partant du principe que chaque cellule contient 5 à 15 copies du plasmide pB10 (7 en moyenne) et une copie d'ADN chromosomique (Adamczyk & Jagura-Burdzy, 2003). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 30. Ils montrent que :

- les quantités de pB10::mini-Tn5-*gfp1* et de DH5 α mesurées étaient respectivement 10 et 100 fois inférieures aux valeurs attendues;
- la relation entre le nombre de copies attendu et le nombre de copies mesuré était linéaire. La proportion des plasmides par rapport à leur hôte était stable d'un échantillon à l'autre. Ceci montrait une performance constante de la récupération et de la quantification de l'ADN par les méthodes choisies;
- le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp1* et le chromosome de DH5 α étaient respectivement quantifiables de 10^3 à 10^8 et de 10^4 à 10^7 copies par gramme de fèces.

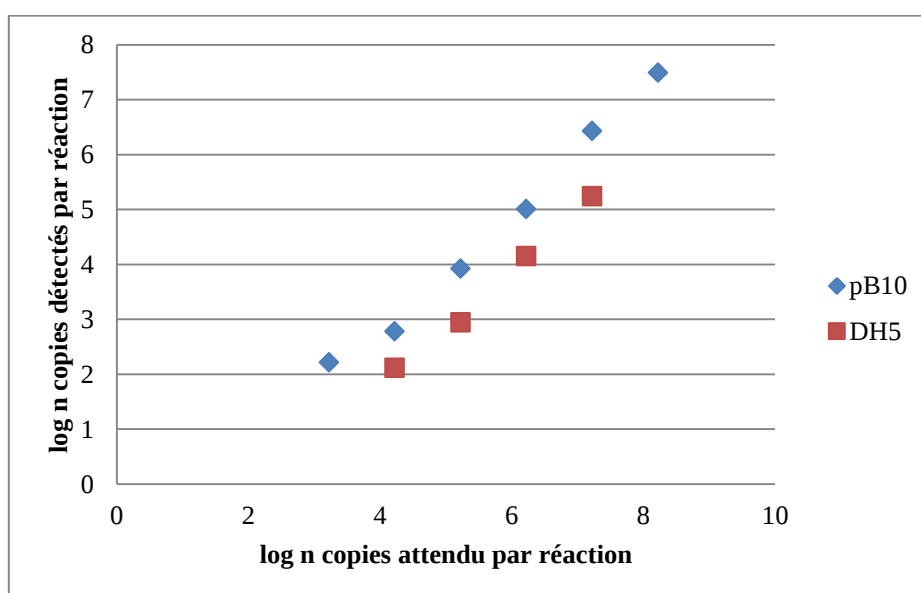


Figure 30. Sensibilité de la méthode de détection de DH5 α et de pB10 dans les fèces murines. Les réactions de qPCR ont été réalisées en duplicats et les valeurs représentées correspondent aux moyennes de duplicats. Les écarts entre les valeurs étaient trop faibles pour être représentés sur les points moyens.

Les résultats d'amplification obtenus pour les gammes étalons montrent que la quantification par qPCR reste fiable jusqu'à 10^2 copies/réaction pour pB10, et 10^3 copies/réaction pour DH5 α . Ce sont les limites en deçà desquelles la relation entre le seuil Ct et la concentration d'ADN n'était plus linéaire (Figure 31).

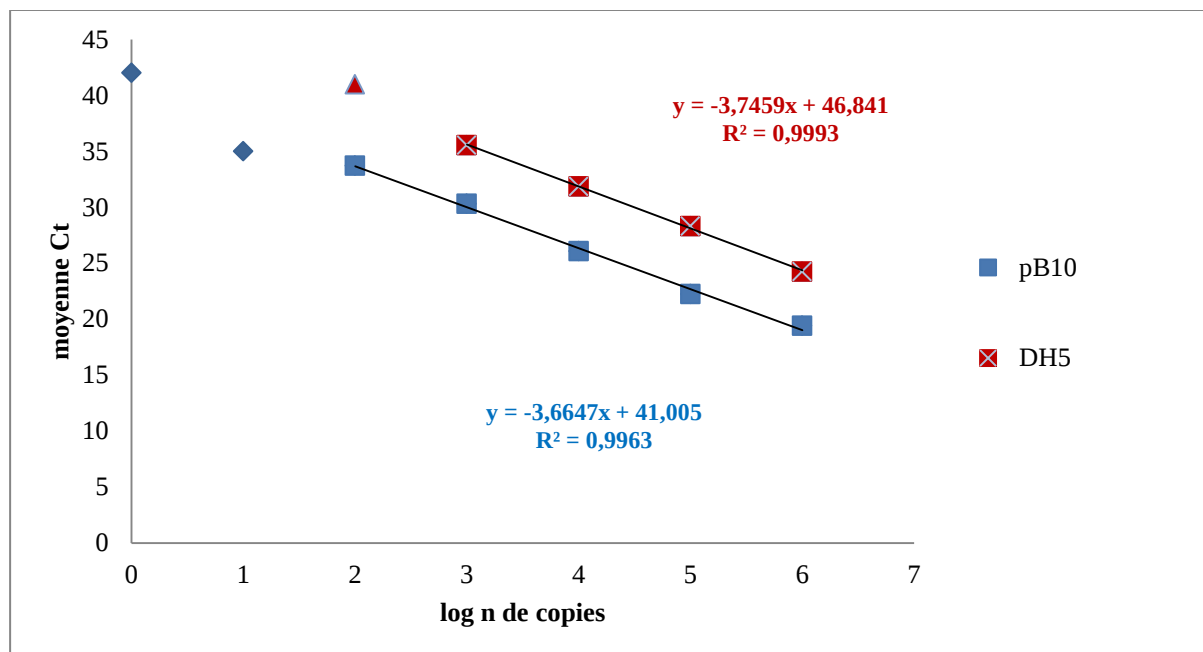


Figure 31. Détermination de la limite de détection de pB10 et de DH5 α sur ADN cible pur.

b) Détection de DH5 α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) dans les fèces de souris inoculées

Après avoir vérifié la faisabilité d'une détection par qPCR de DH5 α et de pB10::mini-Tn5-*gfp1* dans l'ADN issu de fèces, CM363 et son plasmide ont été recherchés dans les fèces de souris inoculées selon le protocole présenté dans la Figure 21.

La Figure 32 montre que les ADN de DH5 α et de pB10::mini-Tn5-*gfp1* étaient détectables dès J₁ dans les fèces des souris inoculées avec CM363. Les quantités mesurées étaient maximales à J₁ et décroissaient ensuite rapidement pour atteindre la limite de détection à J₂ pour l'ADN de DH5 α , et à J₃ pour le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp1*. L'évolution des signaux n'était *a priori* pas influencée par le traitement antibiotique administré aux souris (évolution homogène en présence ou non de streptomycine). Le rapport entre le nombre de copies de pB10 et celui de DH5 α (de l'ordre de 10^2) était cohérent avec celui constaté lors des ajouts dosés et stable pendant les 48 premières heures. Ces résultats sont en faveur de l'absence de transfert détectable du plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp1* vers la flore indigène. Les plasmides détectés étaient hébergés par la souche CM363.

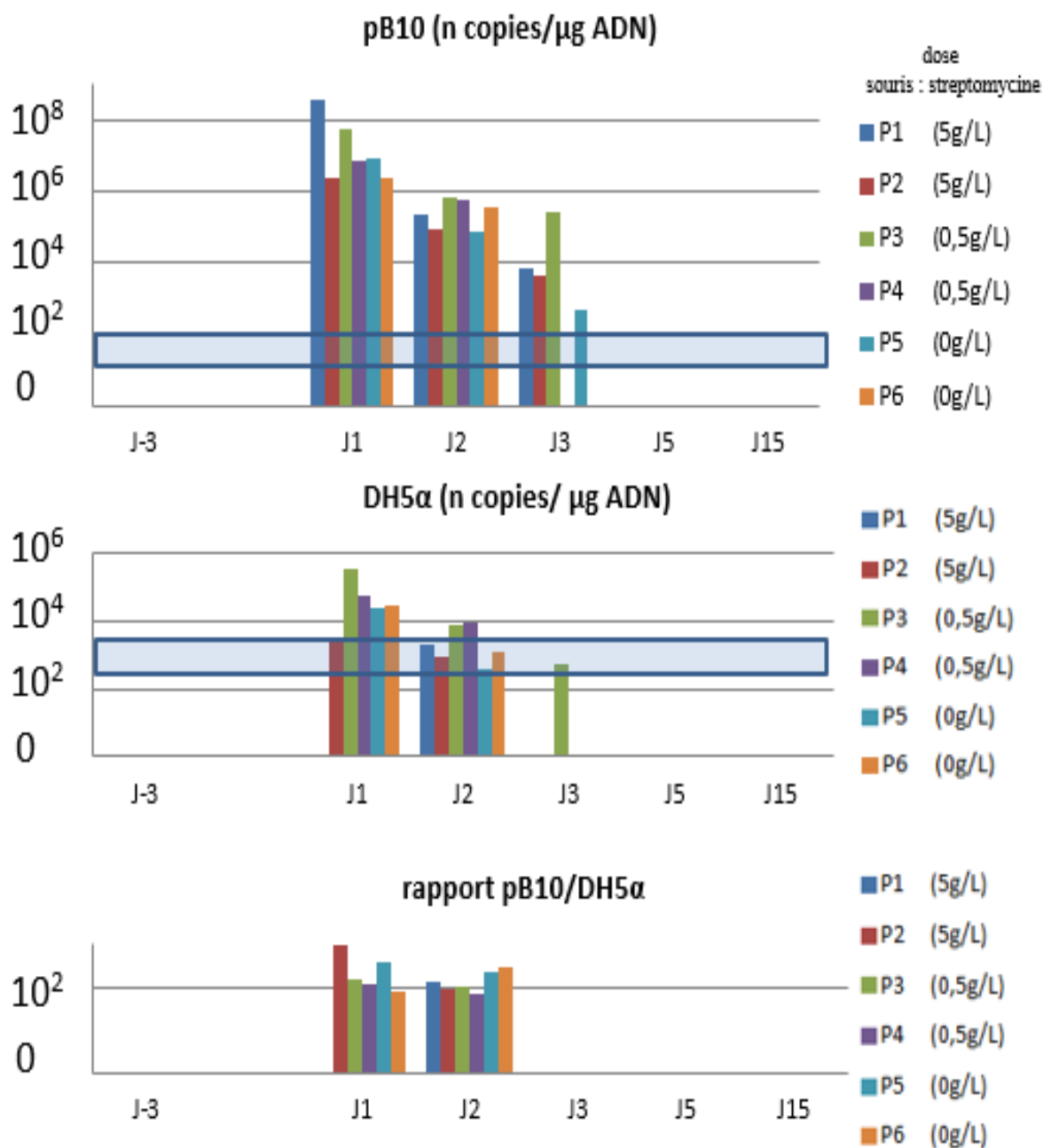


Figure 32. Evolution des quantités de pB10::mini-Tn-*gfp1* et de DH5α dans les ADN totaux de fèces de souris inoculées par la souche vectrice CM363.

Chaque point représente une moyenne de 2 valeurs (un échantillon analysé en duplicat en qPCR). Les écarts entre les valeurs étaient trop faibles pour être représentés sur les points moyens. La zone bleue définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par qPCR).

3. Elaboration d'« amorces/sondes » spécifiques pour la détection de *E. coli* Δfli par qPCR

a) Identification de séquences cibles pour *E. coli* Δfli

Nous disposions d'un fragment de séquence de *E. coli* Δfli de 2865 b, comportant le vecteur de clonage. Celui-ci avait servi à supprimer une série de gènes *fli* (*fliF-fliR*) du génome de *E. coli* K12 MG1655 dont Δfli est dérivée. Il s'agissait de localiser dans cette séquence des régions uniques pouvant servir des cibles spécifiques pour une PCR quantitative.

Pour cela, des recherches d'homologies de séquence ont été effectuées grâce à BlastN (Blast pour « Basic Local Alignment Search Tool » et N pour nucléotides) (blast.ncbi.nlm.nih.gov). BlastN est un logiciel d'alignement et de comparaison de séquences ADN avec d'autres séquences de la banque de données GENBANK.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 33.

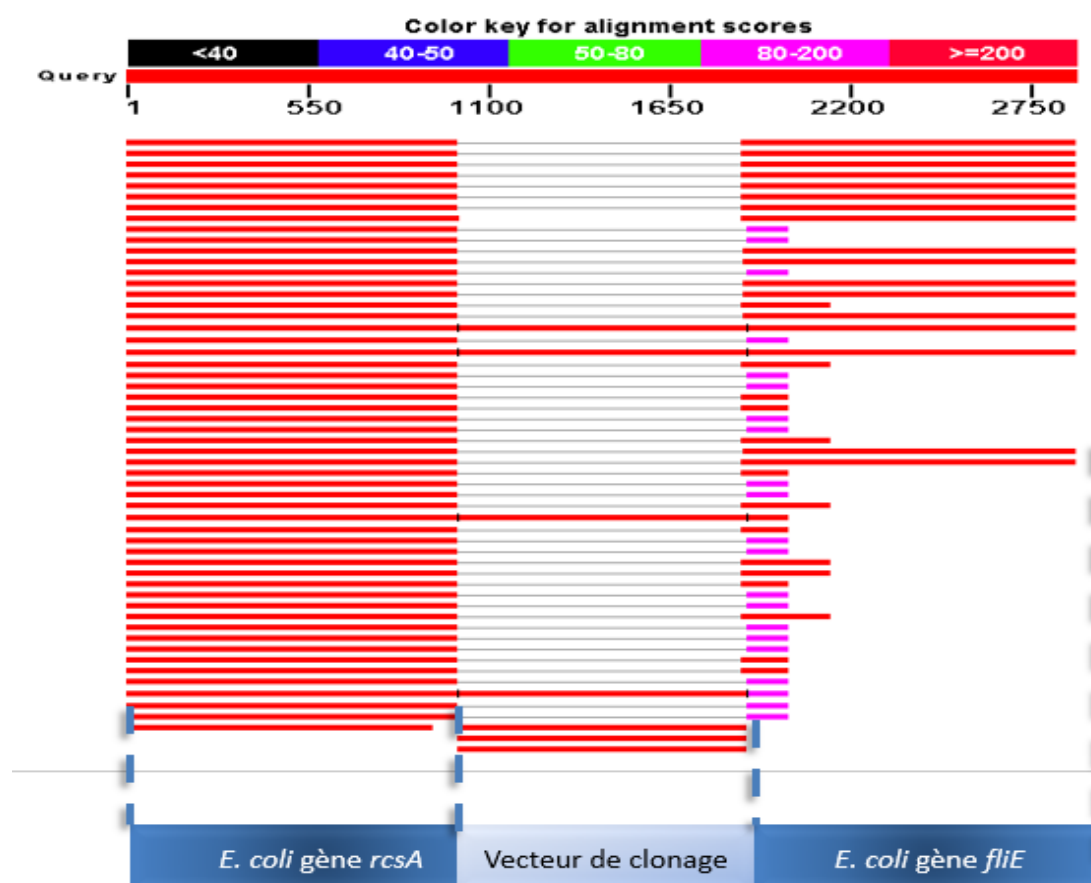


Figure 33. Comparaison d'un fragment de séquence de *E. coli* Δfli par BlastN.

Les traits rouges symbolisent des séquences présentant une forte homologie avec la séquence cible. Les noms et l'origine des gènes présentant une forte homologie sont représentés schématiquement sur fond bleu.

Les jonctions entre le génome de *E. coli* et le vecteur de clonage qui y a été inséré peuvent donc être facilement identifiées. Ces jonctions sont uniques et spécifiques de *E. coli* Δfli . Elles ont donc été utilisées pour l'élaboration d'amorces (*fli5 F* et *R* ainsi que *Fli3 F* et *R*) et de sondes (*TaqMan S_fli 5* et *S_fli3*) spécifiques, situées de part et d'autre de ces jonctions (Figure 34 et Tableau 13).



Figure 34. Amorces et sondes conçues pour la détection de *E. coli* Δ fli par qPCR.

b) Spécificité des couples d'amorces pour *E. coli* Δ fli

Tout d'abord, la spécificité de deux couples d'amorces vis-à-vis de leur cible a été estimée en PCR qualitative. Les couples d'amorces ont été utilisés pour des amplifications à partir de l'ADN extrait de *E. coli* Δ fli et d'autres souches de *E. coli* (DH5 et MG1655). Pour l'ADN de *E. coli* Δ fli, nous avons obtenu des amplicons de taille attendue (environ 200 pb) avec le couple d'amorces « fli5 ». Les amorces « fli3 » produisaient également des fragments de taille attendue, mais provoquaient en plus la synthèse d'autres amplicons de taille supérieure.

Avec les autres souches de *E. coli*, les amplicons obtenus avec les amorces « fli3 » étaient non spécifiques (seuls les résultats pour *E. coli* MG1655 sont montrés) en raison d'une moindre spécificité de ces amorces vis-à-vis de la région ciblée (Figure 35). Pour ces souches aucune amplification n'a été constatée avec les amorces « fli5 ».

Les couples d'amorces ont ensuite été testés avec des ADN totaux extraits des fèces de trois souris différentes. Lors de cet essai, aucune amplification n'a été constatée pour le couple d'amorces « fli5 », tandis que des amplicons de tailles différentes de celle recherchée ont été observées pour le couple « fli3 ». La spécificité de ce jeu d'amorces pouvait toutefois être améliorée en PCR quantitative grâce à l'adjonction de la sonde TaqMan. En effet, aucun signal n'a été détecté lors des qPCR utilisant le couple amorces /sonde « fli 3 » avec les souches de *E. coli* DH5 et MG1655, ni avec des échantillons de fèces de souris non inoculées.

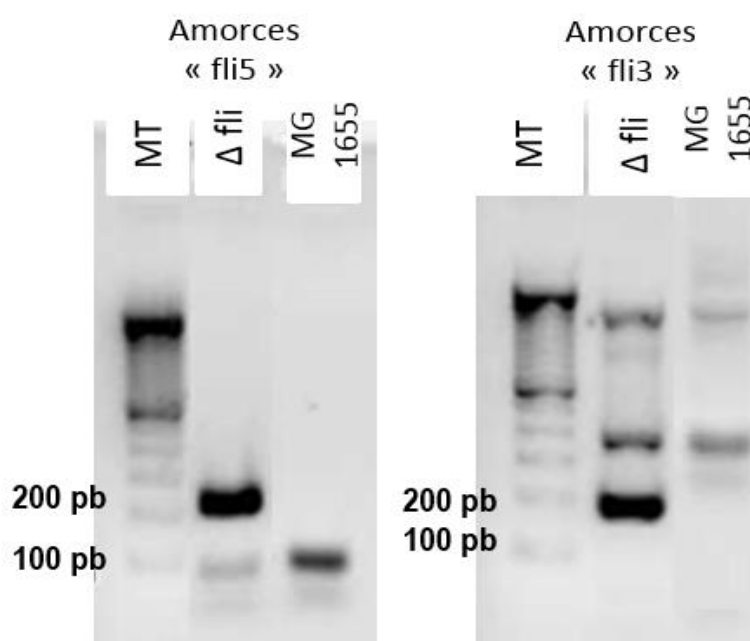


Figure 35. Migration sur gel d'agarose des produits PCR obtenus avec les amorces « fli » (MT – marqueur de taille, pb – paires de bases).

c) Efficacité de PCR des différentes combinaisons « sonde /amorces »

L'efficacité de qPCR pour les combinaisons « sonde/amorces » « fli3 » et « fli5 » a été estimée afin de sélectionner la meilleure. Dans ce but, des réactions de qPCR ont été réalisées avec les deux couples d'amorces/sonde, en faisant varier le nombre de copies d'ADN génomique de *E. coli* Δfli dans une gamme de concentrations (variant de $4,4.10^7$ copies à $4,4.10^0$ copies par réaction). Pour chaque concentration, 3 réactions de qPCR ont été réalisées. Les résultats sont présentés sur les Figures 36 et 37.

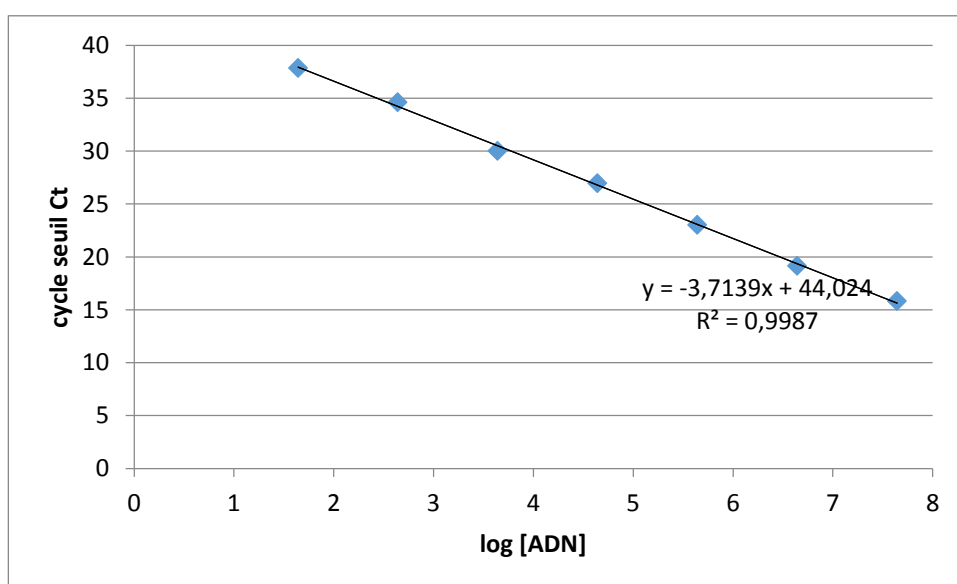


Figure 36. Estimation de l'efficacité de la qPCR avec les combinaisons sonde/amorces « fli5 » .

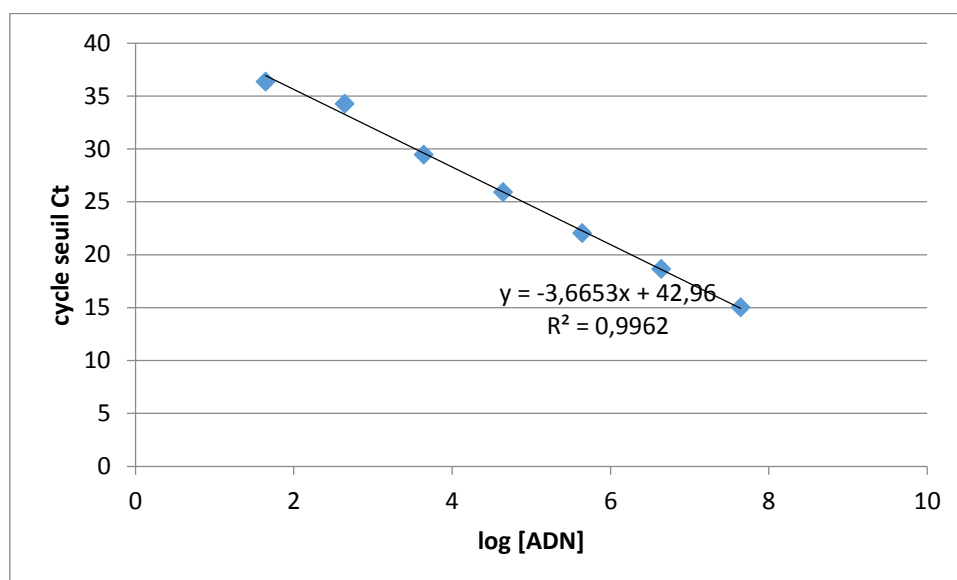


Figure 37. Estimation de l'efficacité de la qPCR avec les combinaisons sonde/amorces « fli3 » .

L'efficacité E d'une réaction de qPCR est calculée selon la formule :

$$E = (10^{(-1/\text{pente})} - 1) * 100$$

La pente correspond au coefficient directeur de la droite de régression entre les valeurs de Ct (cycle seuil de détection) et le log de la concentration en ADN correspondant. La droite de régression est obtenue pour la gamme de dilution de séquences cibles. Ainsi, une efficacité de 100% correspond à une pente de -3,33 sur la droite étalon. Cela signifie qu'à chaque cycle, la quantité de produits PCR double.

Selon les critères définis dans la norme XP NF T90-471, les amplifications PCR sont généralement considérées comme bonnes lorsque l'on obtient un coefficient de corrélation $R^2 > 0,99$ (signifiant un bon alignement de l'ensemble des points de gamme sur la droite de régression) et une efficacité comprise entre 75% et 125%. Ceci correspond à un coefficient directeur de la droite de régression compris entre -4,115 et -2,839. En dehors de cette fourchette, le système ne peut être considéré comme valide.

Pour le couple amorces/sonde « fli 5 », la pente de la droite de régression, était égale à -3,7139. L'efficacité calculée était égale à 85,8%. Cela signifie que les valeurs de Ct obtenues étaient légèrement inférieures à celles attendues pour la gamme de dilution des ADN. Pour le couple amorces/sonde « fli 3 », la pente de la droite de régression était égale à -3,6653, donc plus proche de la valeur idéale (-3,33). L'efficacité calculée était de 87,5%.

En conclusion, l'efficacité de qPCR avec le couple « fli 3 » était supérieure au couple « fli 5 ». Sachant que l'utilisation de la sonde TaqMan a permis d'augmenter la spécificité de la réaction de qPCR, le couple sonde/amorces « fli 3 » a été retenu pour la suite de la mise au point de la qPCR.

d) Optimisation des conditions de qPCR

Afin d'optimiser la sensibilité de la qPCR, différents essais ont été réalisés en faisant varier successivement les concentrations des amorces, de la sonde puis de l'ADN total.

(1) Détermination des concentrations optimales d'amorces pour la détection de E. coli Δfli

Des réactions de qPCR ont été réalisées deux fois en triplicat avec des concentrations en amorces variables (0,3 - 1 μM). Les tests ont été effectués sur de l'ADN génomique pur de *E. coli* Δfli (10⁴ copies par réaction) et à une concentration de sonde fixe (0,1 μM). Les résultats sont présentés dans la Figure 38.

La meilleure détection (avec le cycle seuil le plus précoce : 30,32) a été obtenue pour une concentration de 0,6 μM. Cette concentration a donc été retenue pour les réactions de qPCR.

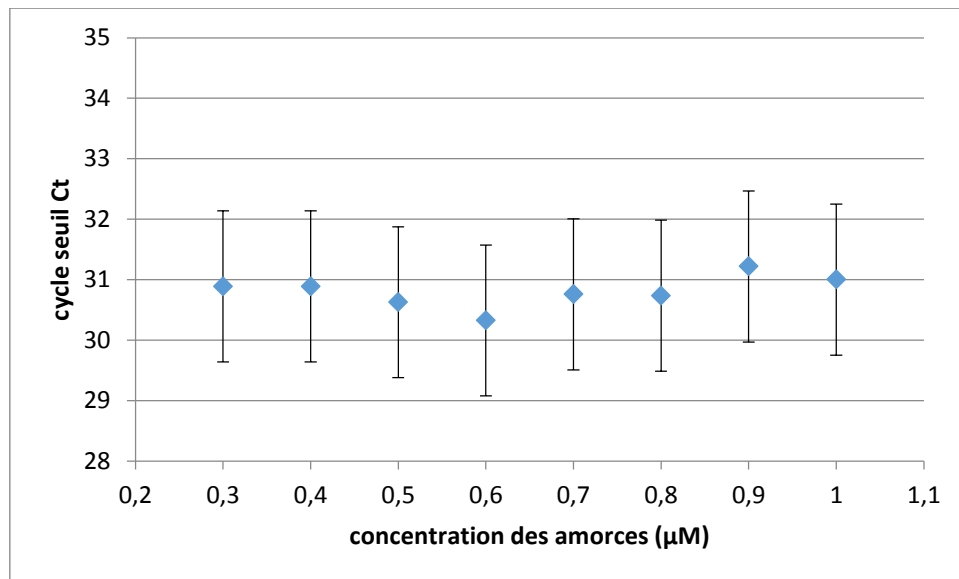


Figure 38. Optimisation de la concentration des amorces « fli 3 » pour la détection de *E. coli* Δfli .

Pour chaque concentration, la valeur représentée correspond à la moyenne de 6 valeurs de Ct et la barre d'erreur représente leur écart type.

(2) Détermination de la concentration optimale de sonde pour la détection de *E. coli* Δfli

Deux séries de trois réactions de qPCR ont été réalisées avec l'ADN de *E. coli* Δfli (10^4 copies) en faisant varier la concentration de sonde (0,1 - 0,4 μM) et à concentration d'amorces fixe (0,6 μM). Les résultats sont présentés dans la Figure 39.

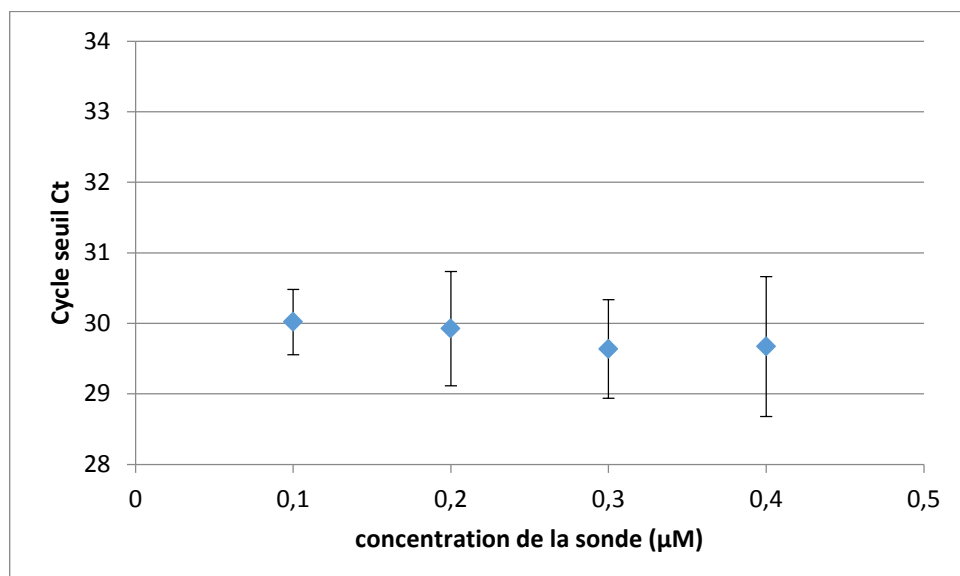


Figure 39. Optimisation de la concentration de la sonde « fli 3 » pour la détection de *E. coli* Δfli .

Pour chaque concentration, la valeur représentée correspond à la moyenne de 6 valeurs de Ct et la barre d'erreur représente leur écart-type.

Aucune différence marquée n'a été observée en termes de Ct moyen lorsqu'une concentration de 0,3 ou 0,4 μM était utilisée. En revanche, l'écart-type était moins important pour la concentration de 0,3 μM . Les réactions de qPCR ont donc été réalisées avec cette concentration de sonde.

(3) Détermination de la concentration optimale d'ADN total pour la détection de *E. coli* Δfli

Le but de cette étape était de trouver le meilleur compromis entre une concentration d'ADN matrice (extrait de fèces) la plus élevée possible et une réaction d'amplification par qPCR optimale. Pour cela, nous avons préparé un échantillon de fèces inoculé avec 10^7 UFC de *E. coli* Δfli et avons réalisé une extraction avec la méthode « FastPrep Soil ». Les réactions de qPCR ont été réalisées, ensuite, en duplicat en utilisant des concentrations croissantes de l'ADN extrait (10 - 200 ng).

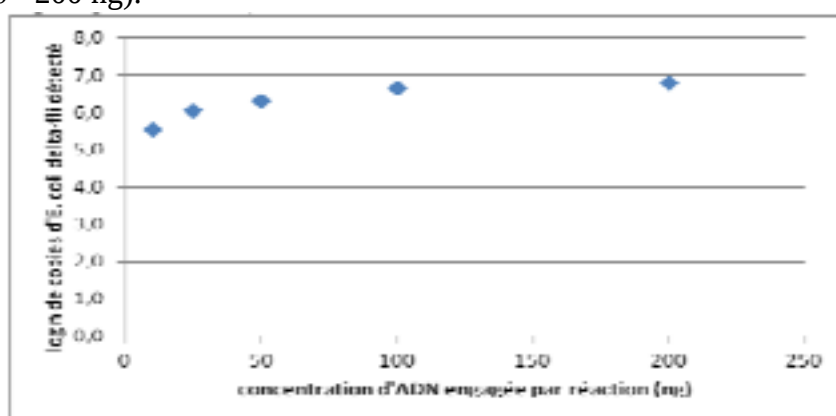


Figure 40. Concentration d'ADN matrice optimale pour la détection de *E. coli* Δfli par qPCR.

Les concentrations d'amorces et de sonde sont fixes (égales à 0,6 μM et 0,3 μM respectivement). La valeur représentée correspond la moyenne des 2 valeurs de PCR.

Les résultats obtenus (Figure 40) montrent que le nombre de copies de *E. coli* Δfli détecté était relativement proportionnel à la quantité d'ADN apportée jusqu'à la concentration de 50 ng par réaction de PCR. Pour les concentrations supérieures ou égales à 100 ng cette proportionnalité n'était plus respectée. Deux explications sont possibles :

- une inhibition de la réaction par une trop forte quantité d'ADN total qui a entraîné une moindre accessibilité aux séquences ciblées,
- l'existence d'un plus grand nombre de contaminants, en relation avec un apport plus important d'ADN extrait.

Considérant les protocoles établis pour DH5 α et pB10 (25 ng d'ADN initial) et les quantités d'ADN extrait disponibles et considérant les possibles phénomènes d'inhibitions déterminés plus haut, les qPCR ont été réalisées avec 25 ng d'ADN matrice.

(4) Sensibilité globale de la méthode

La sensibilité globale de la méthode choisie in fine (couple sonde/amorces *fli3*, concentration d'amorces de 0,6 μM , concentration de sonde de 0,3 μM et quantité d'ADN matrice de 25 ng) a été évaluée. Dans ce but, des quantités décroissantes de *E. coli* Δfli

(pB10::*rfp*)(de 10^8 à 10^1 UFC) ont été ajoutées à des échantillons de 50 mg de fèces de souris immédiatement avant l'extraction de l'ADN avec le kit « FastPrep Soil ». Les réactions de qPCR ont ensuite été réalisées en duplicat. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 41.

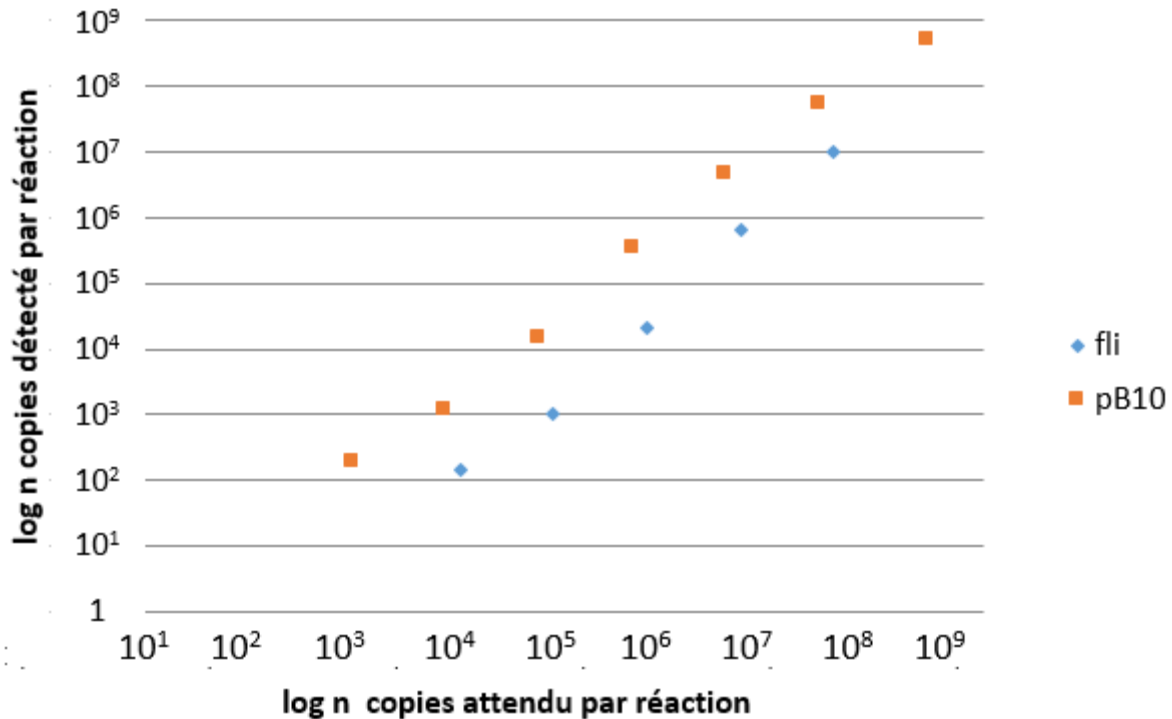


Figure 41. Sensibilité globale de la méthode de détection de Δfli (pB10) dans les fèces murines.

Les réactions de qPCR ont été réalisées en double et les valeurs représentées correspondent aux moyennes de duplicatas. Les écarts entre les valeurs sont trop faibles pour être représentés sur les points moyens.

L'essai a montré que :

- les quantités de pB10::*rfp* et de Δfli mesurées étaient respectivement environ 10 et 100 fois inférieures aux valeurs attendues;
- la relation entre le nombre de copies attendu et le nombre de copies mesuré était linéaire. La proportion des plasmides par rapport à leur hôte était stable d'un échantillon à l'autre. Une performance constante de la récupération et de la quantification de l'ADN a été observée ;
- le plasmide pB10::*rfp* et le chromosome de Δfli étaient respectivement quantifiables de 10^3 à 10^9 et de 10^4 à 10^8 copies par gramme de fèces.

e) Suivi de *E. coli* Δfli et de pB10::*rfp* par qPCR dans les fèces des souris inoculées

La détection spécifique de *E. coli* Δfli par qPCR étant mise au point, la souche donneuse LBM13 et son plasmide pB10::*rfp* ont été recherchés dans des fèces de souris inoculées selon le protocole expérimental utilisé (Figure 21).

Les fèces ont été collectées selon le calendrier préétabli. Les ADN totaux ont été extraits avec la méthode « FastPrep Soil ». Δfli et pB10::*rfp* ont été quantifiés par qPCR.

Les résultats de la quantification ont révélé (Figure 42) :

- la présence d'ADN de Δfli et de pB10::*rfp* dès J₁ dans les fèces des souris inoculées avec LBM13,
- une influence du traitement antibiotique sur la détection de la souche donneuse (Figure 42) :
 - o dans les fèces des souris traitées par la plus forte dose de streptomycine, Δfli est restée détectable durant toute la durée de l'expérimentation.
 - o la présence de Δfli dans les fèces des souris traitées avec la dose réduite d'antibiotique ou avec la solution témoin était plus aléatoire.

Lorsque la présence de Δfli était détectée, le rapport pB10/ Δfli était en faveur d'un transfert :

- à J2 pour une des deux souris traitées par 0,5 g/L de streptomycine,
- à J5 pour une des deux souris traitées par 5 g/L de streptomycine,
- à J15 pour une (différente de la précédente) des deux souris traitées par 5 g/L de streptomycine.

Il est à souligner, que pB10 a été détecté en l'absence de Δfli :

- à J2, J3, J5 et J15 pour une des deux souris traitées par 0,5 g/L de streptomycine,
- à J2 et J15 pour une des deux souris non traitées par streptomycine.

Ces résultats suggèrent l'existence de transferts du plasmide pB10::*rfp* vers la flore endogène.

Cette première série de résultats montre que la détection par qPCR des souches donneuses (DH5 α et Δfli) ainsi que celle du plasmide pB10 dans les fèces est possible. Comme attendu, la colonisation de Δfli a été favorisée en présence de streptomycine. Pour Δfli , pour laquelle une colonisation plus importante a été détectée, des transferts plasmidiques ont été mis en évidence chez des souris traitées ou non avec de la streptomycine.

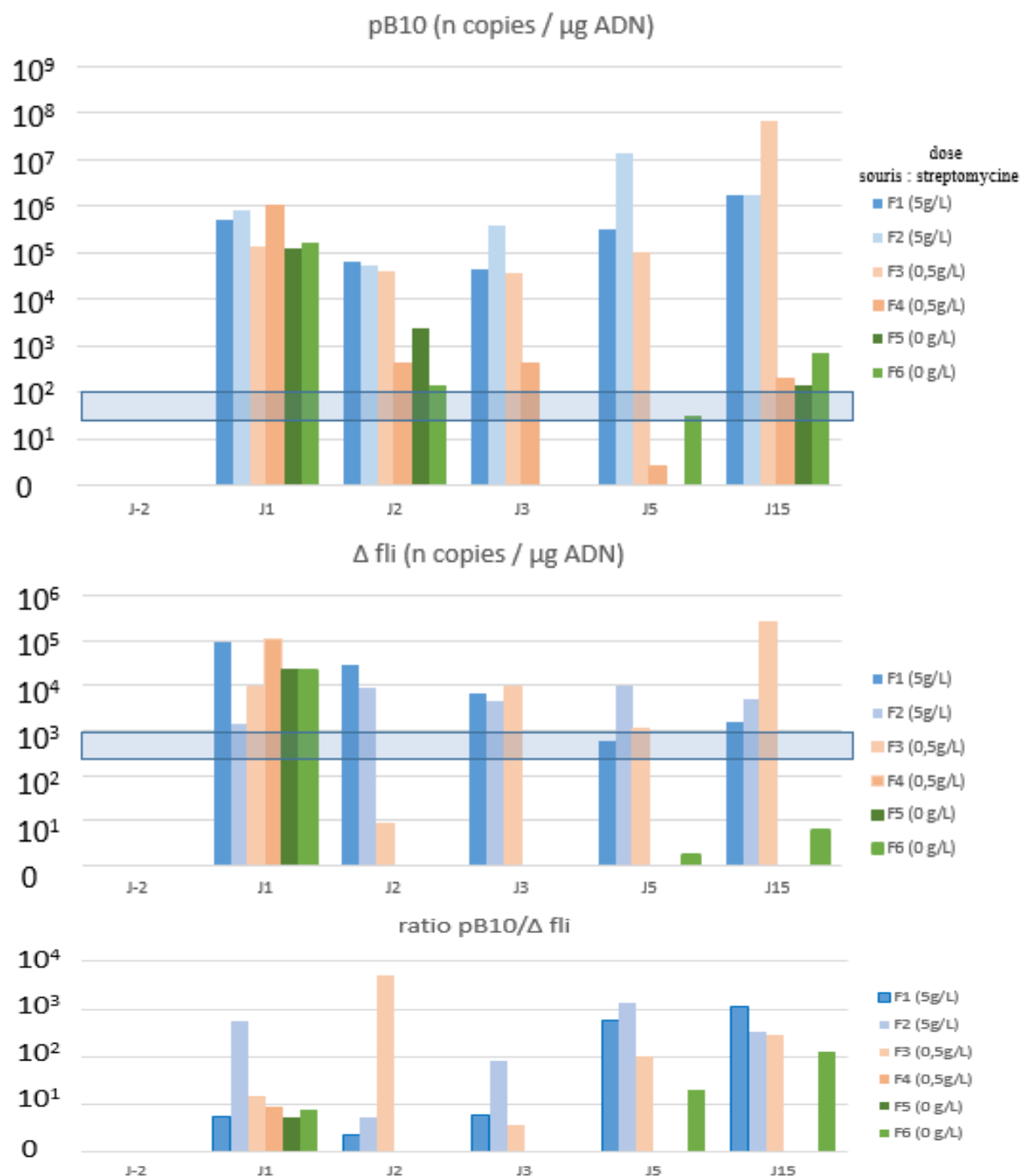


Figure 42. Evolution des quantités de pB10::*rfp* et de Δfli par qPCR, dans des ADN totaux de fèces de souris inoculées par la souche vectrice LBM13.

Chaque colonne représente une moyenne de 2 valeurs (un échantillon analysé en duplicat en qPCR). Les écarts entre les 2 valeurs sont trop faibles pour être représentés. Les rectangles bleutés correspondent aux zones d'incertitude de détection.

C. Suivi de pB10 ::mini-Tn-gfp1 et de sa donneuse par cytométrie en flux

1. Mises au point de la détection de *E. coli* DH5 α (pB10 ::mini-Tn-gfp1) par cytométrie en flux

a) Définition des zones de comptage

Nous avons, dans un premier temps, défini des zones permettant de détecter la population cellulaire non marquée et de la distinguer du bruit de fond. Pour cela, des acquisitions ont été préalablement réalisées avec le milieu de dilution choisi pour cette étude (PBS filtré sur 0,2 μ m) en absence et en présence de différentes dilutions de cellules. Le passage du PBS seul a permis de définir la zone du bruit de fond lors d'une acquisition en granulométrie relative (SSC) (Figure 44 A).

Des acquisitions en SSC ont ensuite été réalisées pour des suspensions bactériennes pures de *E. coli* DH5 α (CM55) non marquées (environ 10^7 cellules/mL). Les cellules bactériennes étaient facilement identifiables par l'analyse de la distribution du signal en SSC (Figure 44 B) avec un pic net en regard de la valeur 10^1 (unité arbitraire).

Enfin, le surnageant de fèces fraîches d'une souris non inoculée a été préparé selon le protocole choisi pour cette étude et dilué d'un facteur 10^4 dans du PBS filtré. Lors des acquisitions en cytométrie, le pic en SSC a également pu être observé en regard de la graduation 10^1 (unité arbitraire) (Figure 44 C). En analysant la distribution du signal acquis, un seuil d'acquisition en SSC a pu être fixé à SSC=70 (unité arbitraire) (Figure 44 C, seuil symbolisé par la ligne rouge) de manière à limiter l'acquisition du bruit de fond. Ainsi, seuls les événements dont la granulosité relative dépassait ce seuil ont été acquis par le fluorimètre.

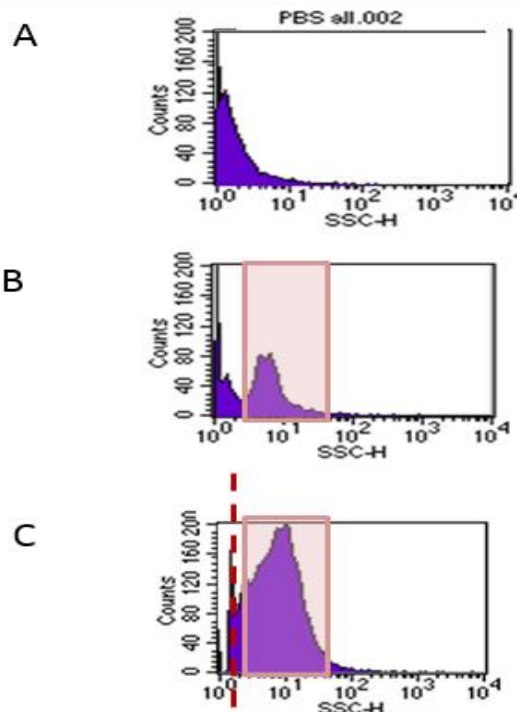


Figure 43. Définition de l'évènement cellulaire non marqué et du bruit de fond en CMF.

Nous nous sommes assurés que les cellules porteuses du plasmide pB10::mini-Tn5-gfp1 émettaient un signal de fluorescence détectable par le cytomètre. Pour ce faire, une suspension bactérienne pure de *E. coli* DH5 α (pB10::mini-Tn5-gfp1) a été réalisée en PBS filtré (environ 10^7 cellules/mL) puis analysée en cytométrie. La distribution de la fluorescence

obtenue pour le canal FL1 montrait un pic net en regard de la graduation 10^2 (unité arbitraire) (Figure 44).

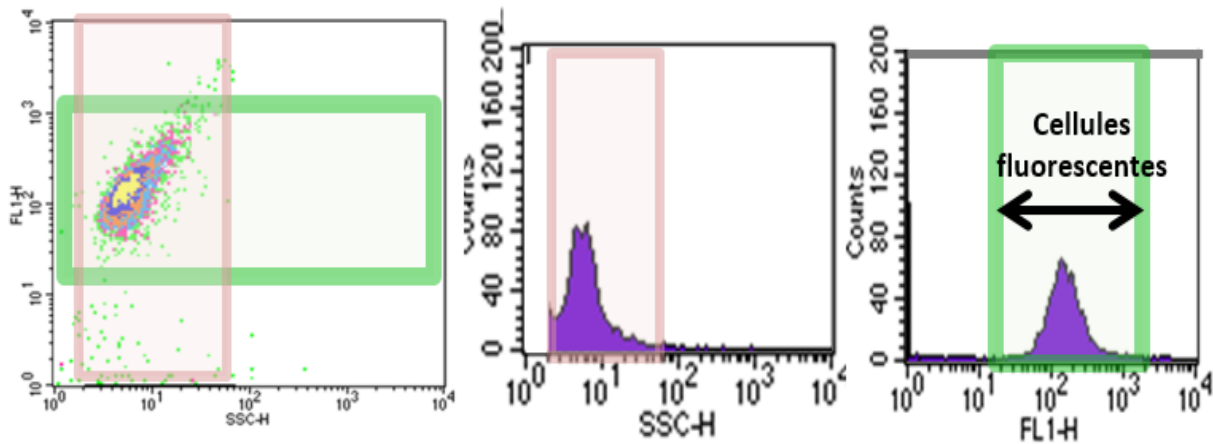


Figure 44. Cytogrammes obtenus avec *E. coli* DH5 α (pB10::mini-Tn-*gfp1*).
Les gains des photomultiplicateurs ont été réglés à 300 mV (SSC) et 400 mV (FL1).

Après avoir identifié les régions des cytogrammes correspondant aux cellules fluorescentes ou non marquées, nous avons défini les fenêtres d'analyse pour le comptage des événements d'intérêt.

Ainsi, deux fenêtres (R2 et R1) ont été définies pour représenter respectivement les populations de cellules fluorescentes et non fluorescentes. Pour la détection des bactéries fluorescentes, la fenêtre R2 a été dessinée à l'intersection des régions FL1=[$2 \cdot 10^1$, $8 \cdot 10^2$] et SSC=[$2 \cdot 10^0$, $8 \cdot 10^1$] (Figure 45). La fenêtre R1, correspondant aux cellules non fluorescentes, a été dessinée sous la région R2 (Figure 45). La population bactérienne fécale non marquée a pu ainsi être énumérée dans la région R1 et les cellules fluorescentes dans la région R2.

R2 : cellules fluorescentes

R1 : cellules non marquées

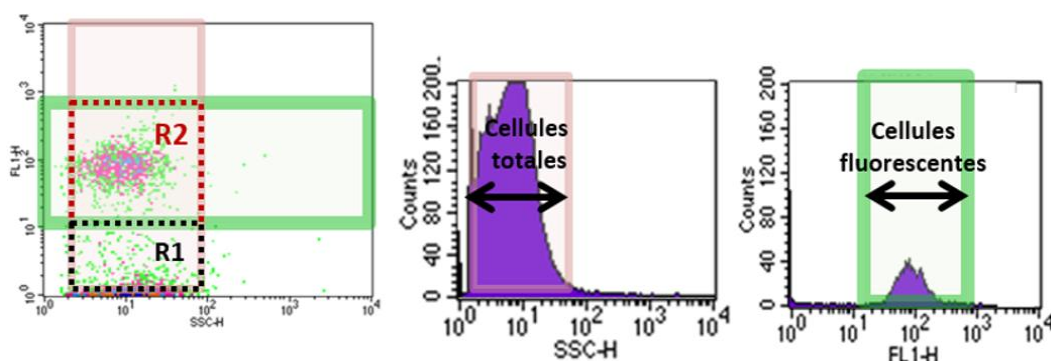


Figure 45. Définition des fenêtres d'acquisition.

b) Vérification de la pertinence du protocole 1

La justesse de la quantification de cellules fluorescentes et non fluorescentes dans les fèces murines avec le protocole 1 a été évaluée.

(1) Cellules non marquées

Pour les cellules non marquées, nous avons vérifié que, dans les fèces, des particules de granulosité interne (SSC) similaire à celle des cellules bactériennes ne faussaient pas les énumérations dans la région R1.

Pour cela, les surnageants ont été préparés à partir des fèces de cinq souris non inoculées. Deux démarches ont été effectuées en parallèle. D'une part, l'énumération des événements cellulaires totaux a été réalisée selon le protocole 1. D'autre part, les cellules de ces mêmes surnageants ont été marquées au SYBR green II avant d'être énumérées en cytométrie en flux. La démarche utilisée pour définir la région de quantification des événements marqués était analogue à celle détaillée dans le paragraphe précédent. Les énumérations cellulaires obtenues avec ces deux démarches étaient similaires (Tableau 19).

Tableau 19. Fiabilité des énumérations des événements définis par la fenêtre R1.

Echantillon	Fenêtre R1 (cellules/mL)	SYBR Green II (cellules/mL)
1	$1,62.10^9$	$1,34.10^9$
2	$1,66.10^9$	$1,58.10^9$
3	$2,39.10^9$	$1,45.10^9$
4	$2,66.10^9$	$1,41.10^9$
5	$2,81.10^9$	$2,44.10^9$

(2) Cellules fluorescentes

La fiabilité de la quantification cytométrique des événements fluorescents a été évaluée à partir d'ajouts dosés de bactéries fluorescentes dans des suspensions cellulaires issues de fèces. Pour ce faire, un surnageant de fèces d'une souris non inoculée a été préparé selon le protocole 1. Des quantités décroissantes (10^0 à 10^6 cellules/mL) de *E. coli* DH5 α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) (CM363) ont été ajoutées au surnageant. Ces préparations ont été analysées en CMF avec un seuil d'acquisition SSC=70 pendant 120 secondes. Les résultats des énumérations étaient globalement inférieurs (d'environ 1,9 log) aux valeurs attendues et le signal était rapidement perdu, les événements fluorescents devenant indétectables pour des concentrations inférieures à 10^4 cellules/mL (Figure 46). L'énumération des événements fluorescents n'était donc pas fiable avec cette approche, qui de ce fait n'a été retenue que pour réaliser la quantification des événements cellulaires non fluorescents dans les surnageants de fèces.

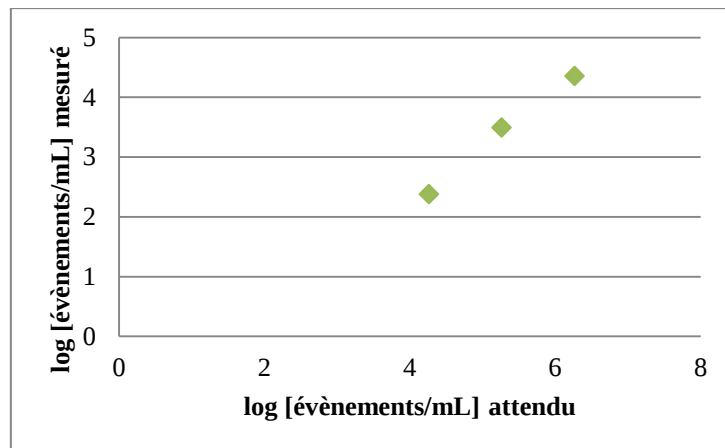


Figure 46. Fiabilité des énumérations des évènements fluorescents selon le protocole 1.

c) Enrichissement du signal fluorescent pour augmenter la sensibilité de la méthode

Le protocole 1 avait été établi afin de montrer la fréquence des évènements fluorescents par rapport aux évènements totaux. La dilution imposée ne nous a permis de détecter qu'une cellule fluorescente pour environ 10^4 à 10^5 cellules non fluorescentes. Afin d'améliorer la sensibilité de la détection des cellules exprimant la GFP de pB10::mini-Tn5-*gfp1*, le signal fluorescent a été enrichi en augmentant la concentration des échantillons analysés. Afin de pouvoir examiner des échantillons fortement concentrés, sans dépasser 4000 évènements/sec (pour que les capteurs aient le temps de revenir à l'état de base entre deux mesures), un seuil d'acquisition adapté a dû être fixé pour le détecteur de fluorescence FL1. Ce seuil (FL1=240 en valeur relative) a été fixé en se basant sur le diagramme obtenu pour une suspension pure de *E. coli* DH5 α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) (CM363). De plus, le temps d'acquisition a été augmenté (900 secondes) afin d'analyser un plus grand nombre de cellules (10^8) tout en permettant d'étudier entre 6 et 12 échantillons / jour (protocole 2).

La fiabilité des énumérations avec le protocole 2 (visant la détection des cellules exprimant la GFP) a ensuite été évaluée. Des quantités décroissantes de *E. coli* DH5 α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) (10^6 à 10^0 cellules /mL) ont été mises en suspension dans un surnageant de fèces préparé comme décrit dans « Matériel et méthodes ». Chaque suspension a été analysée par cytométrie et le nombre d'évènements fluorescents en FL1 a été comptabilisé dans la fenêtre R2. En mesurant la masse de l'échantillon avant et après l'acquisition en cytométrie, le volume d'échantillon analysé a pu être déduit. Pour l'ensemble des suspensions testées, les concentrations d'évènements fluorescents étaient cohérentes avec les concentrations attendues (Figure 47) (linéarité : 10^2 - 10^6 cellules/mL).

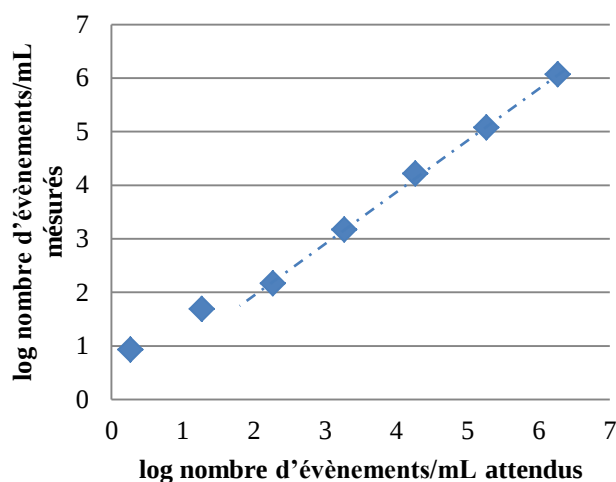


Figure 47. Cohérence des énumérations selon le protocole 2.

2. Détection de DH5α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) dans les fèces de souris inoculées

Après avoir optimisé l'utilisation du cytomètre pour le comptage d'évènements fluorescents rares, la quantification de DH5α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) dans les fèces de souris inoculées a pu être envisagée. Compte tenu de nos résultats préliminaires, nous avons décidé d'appliquer une démarche dissociée en deux acquisitions successives :

- la première acquisition avait pour but d'évaluer la concentration cellulaire totale (protocole 1). La concentration et la proportion d'évènements fluorescents au sein de la population bactérienne fécale pouvaient également être appréciées, lorsqu'ils étaient numériquement importants.
- la deuxième acquisition visait une sensibilité maximale de détection des évènements fluorescents (protocole 2).

Les cellules fluorescentes ont été recherchées sur les mêmes prélèvements de fèces que ceux utilisés pour la quantification par qPCR.

Le protocole d'acquisition en deux temps étant chronophage, des analyses cytométriques réalisées immédiatement après la collecte des fèces étaient difficilement envisageables. Il a donc été décidé de conserver l'ensemble des fèces en aliquots de 250 mg à -20°C au fur et à mesure de la collecte, et de les analyser respectivement 14 jours plus tard, de manière à respecter une même période de congélation pour tous les échantillons. Afin d'évaluer l'effet de ce conditionnement, les échantillons collectés à 24 heures post inoculation ont été analysés avant et après congélation.

Dans les échantillons de fèces collectés à J₁ et analysés immédiatement après collecte, on retrouvait en moyenne $1,8 \cdot 10^7$ cellules fluorescentes/g de fèces et $3 \cdot 10^{11}$ cellules totales/ g de fèces (Figure 48). Pour ces mêmes échantillons analysés après congélation, on retrouvait en moyenne $1,5 \cdot 10^5$ cellules fluorescentes et $3,5 \cdot 10^9$ cellules non marquées/g de fèces. En moyenne, la persistance des cellules recherchées après 14 jours de congélation était de $2 \pm 1\%$ pour les cellules fluorescentes et $1 \pm 0,3\%$ pour les cellules totales.

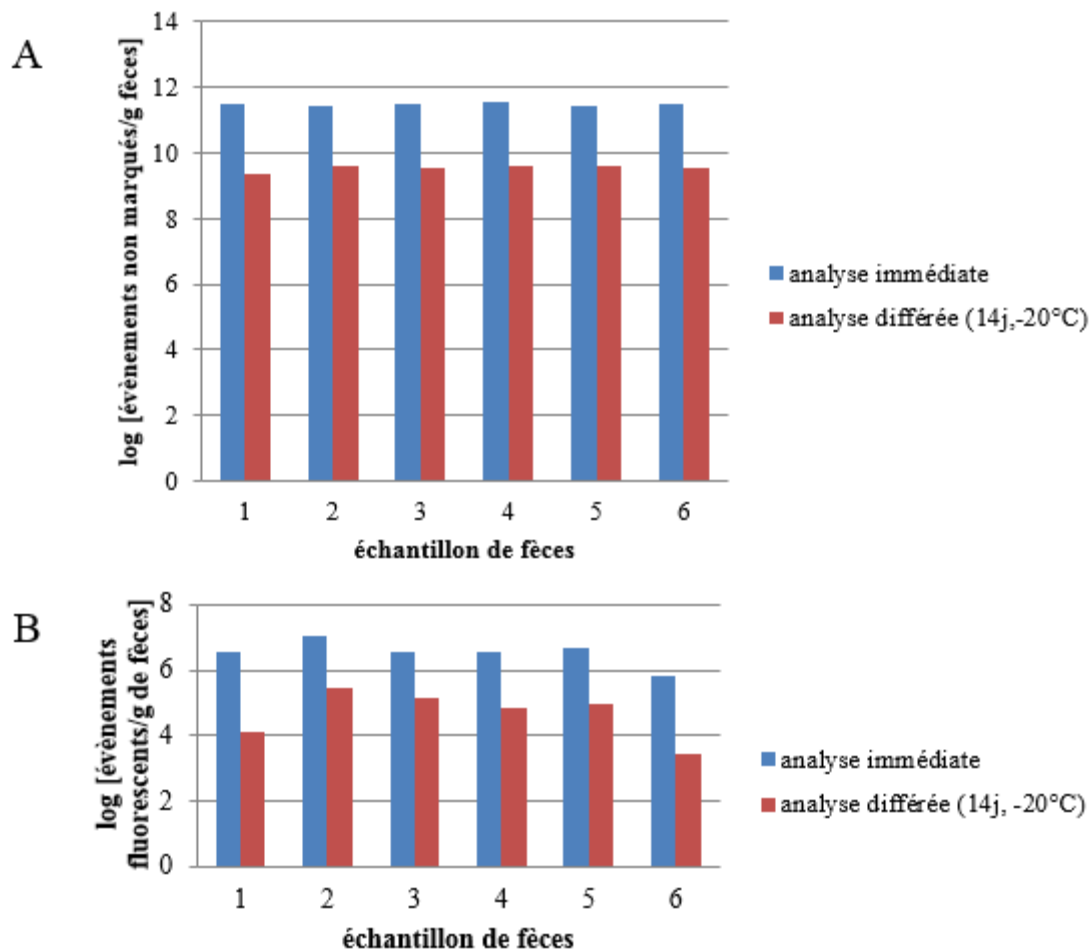


Figure 48. Influence du conditionnement des échantillons sur le nombre d'évènements détectés.

L'ensemble des prélèvements aux différents temps post inoculation ont été analysés après 14 jours de congélation. Une population d'évènements fluorescents définis par la fenêtre R2 a été détectable après congélation dans les échantillons collectés à 48h (pour les six souris inoculées) et à 72h (pour quatre des six souris inoculées) (Figure 49). Dans les échantillons obtenus à J₅ et J₁₅, les évènements fluorescents n'étaient plus détectables. Aucune population fluorescente n'était détectée dans l'ensemble des 18 échantillons de souris témoins testés. L'évolution des signaux ne semblait pas influencée par l'administration de streptomycine.

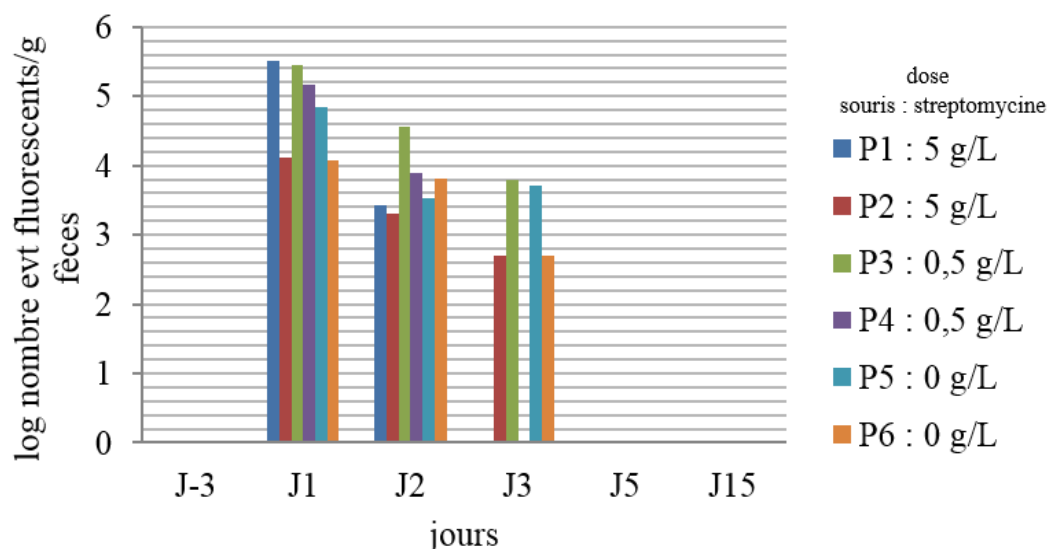


Figure 49. Suivi du nombre d'évènements fluorescents après inoculation de *E. coli* CM363.

3. Mises au point de la détection de *E. coli* Δfli (pB10::*rfp*)

Une suspension de *E. coli* Δfli portant le plasmide pB10::*rfp* (LBM13), réalisée à partir d'une culture de 24 heures sur milieu gélosé, a été analysée par cytométrie. Comme attendu, les cellules étaient parfaitement identifiables par l'analyse de la distribution du signal sur le canal SSC où l'on observe un pic entre les graduations 10^1 et 10^2 (unité arbitraire). En parallèle, un pic a été observé entre 10^1 et 10^2 sur le canal FL1 (fluorescence verte), attestant donc de la présence du marquage chromosomique par le gène de la GFP. Par contre, les acquisitions réalisées sur les canaux FL2 (fluorescence jaune/orange) et FL3 (fluorescence rouge) n'ont pas permis de détecter de signal (Figure 50).

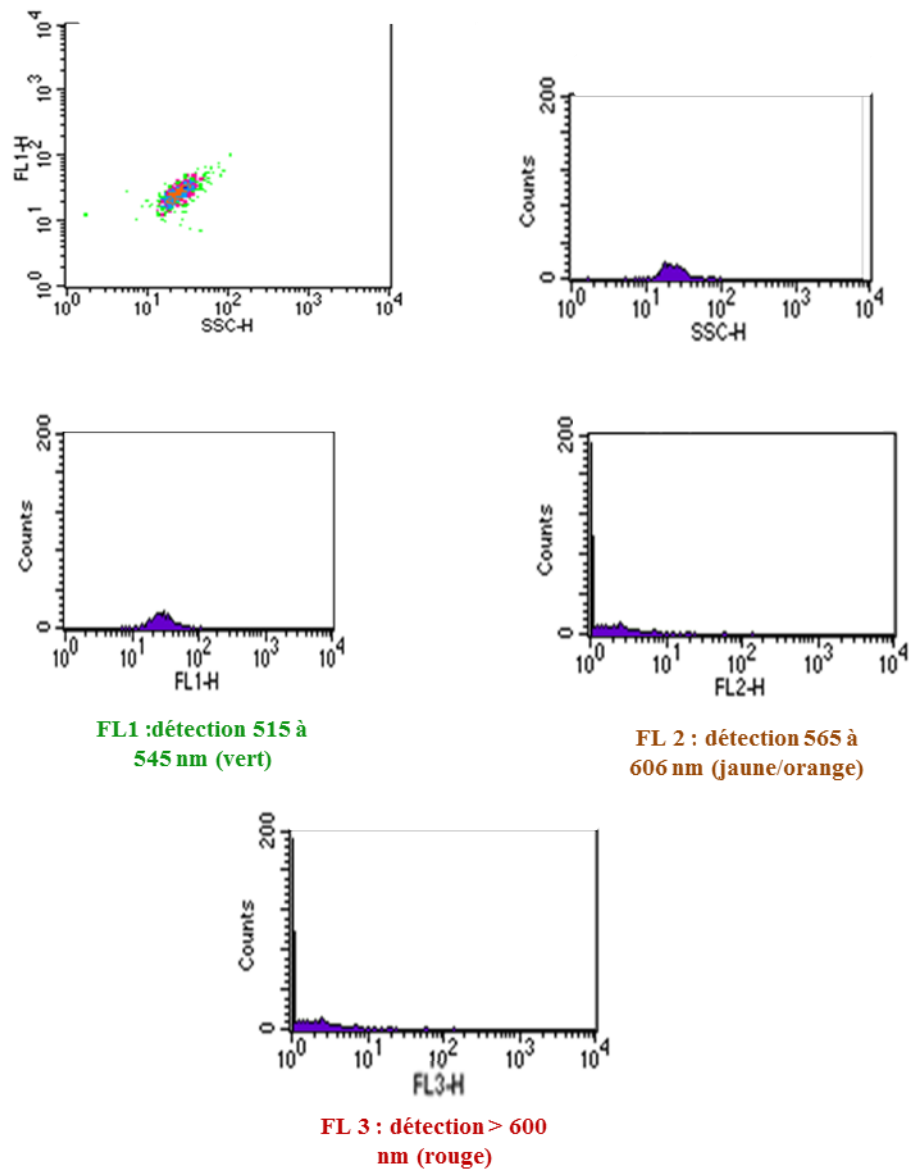


Figure 50. Cytogrammes et diagrammes obtenus pour *E. coli* LBM13. Une suspension de 10^4 cellules/mL de *E. coli* $\Delta fli::gfp$ (pB10::*rfp*) (LBM13) a été analysée en CMF avec des gains de photomultiplicateurs SSC 385, FL1 520, FL2 500.

V. Discussion

Ce travail a permis pour la première fois d'explorer la faisabilité d'un modèle expérimental de détection des transferts de gènes vers l'ensemble du microbiote intestinal murin. Ceci n'avait été jusqu'à présent appliqué qu'à des écosystèmes environnementaux tels que la rhizosphère ou les boues de stations d'épuration (Musovic et al., 2006; Merlin et al., 2011). En effet, l'étude des transferts des gènes de résistance aux antibiotiques *in vivo* n'a été réalisée jusqu'à ce jour qu'en utilisant des modèles essentiellement murins où le devenir d'un plasmide d'intérêt a été évalué après inoculation d'une bactérie donneuse et d'une bactérie receveuse. Cette approche ne permet pas d'explorer l'influence sur les transferts génétiques des différents acteurs présents *in vivo*. L'étude directe des transferts génétiques d'une bactérie donneuse vers l'ensemble du microbiote nécessite de mettre en place une démarche expérimentale permettant de suivre de façon fiable le devenir du plasmide étudié, et est de ce fait plus complexe. A l'aide d'une des méthodes utilisées (qPCR), nous avons pu mettre en évidence de manière inconstante l'existence de transferts du plasmide pB10 d'une des bactéries donneuses testées (Δfli) vers le microbiote intestinal. Ces résultats ont souligné l'importance du choix de la souche donneuse (et, tout particulièrement, de sa capacité de colonisation intestinale : Δfli vs DH5 α) et ont montré que la détection de transferts, bien que plus fréquente en présence de streptomycine, était observée même en l'absence de pression de sélection.

Chart et al. (2000) ont montré que *E. coli* DH5 α était rapidement éliminée après inoculation des souris. Cette souche avait été choisie dans notre étude afin de mimer le comportement d'une bactérie donneuse qui, bien que présente de manière transitoire dans le tube digestif, aurait pu être la source de transferts vers d'autres bactéries résidentes. En effet le transfert de gènes dans l'environnement intestinal peut être un phénomène rapide (Licht et al. 1999; Schjorring et al. 2008). Dans notre étude, la présence de DH5 α dans les fèces n'a été détectée que pendant 48 heures après l'inoculation, indépendamment de l'administration de streptomycine. L'inadaptation de cette souche à l'environnement intestinal ne peut donc pas être contrebalancée par une pression de sélection. Aucun transfert du plasmide pB10 n'a pu être mis en évidence durant la totalité de la période d'étude.

Plusieurs travaux se sont intéressés aux facteurs augmentant les capacités de colonisation intestinale de *E. coli* (Leatham et al. 2005; Fabich et al. 2011; Gauger et al. 2007; Francius et al. 2011). Il a été rapporté que des mutations des gènes codant l'appareil flagellaire améliorait l'implantation intestinale de ces souches, probablement par un gain énergétique lié à l'absence de mobilité et/ou une surexpression de gènes impliqués dans les métabolismes énergétiques (Fabich et al. 2011). Il est probable que les capacités de colonisation de *E. coli* Δfli observées dans notre étude sont en relation avec le fait que cette souche présente des délétions de plusieurs gènes flagellaires. La colonisation de *E. coli* Δfli était favorisée par la présence de streptomycine. Toutefois, les phénomènes de transfert du plasmide étaient également détectés après inoculation de cette souche en l'absence d'administration de streptomycine. Ceci suggère que l'on pourrait, dans des études futures, évaluer l'influence d'un stress chronique sur le TGH en l'absence d'antibiotique.

Schjorring et al. (2008) ont montré, qu'après inoculation à des souris d'une souche de *K. pneumoniae* (donneuse) et d'une souche de *E. coli* (receveuse), seul un échantillonnage prolongé des fèces (30 jours) a permis de détecter l'émergence des transconjugants issus de la flore endogène. Dans notre étude, l'élévation du rapport pB10/ Δfli a été observée à J5 et J15 post inoculation chez deux souris traitées par la plus forte dose de streptomycine.

Par rapport à la culture, la qPCR permet en théorie de détecter de manière plus spécifique des transconjugants au sein d'un microbiote complexe, et ce, quel que soit leur niveau de croissance. De plus cette méthode permet d'analyser des échantillons congelés. Le nombre de génomes examinés reste cependant limité par la quantité d'ADN mis en jeu lors de la réaction d'amplification. Ainsi, en prenant la taille moyenne d'un génome bactérien (2 Mb), l'analyse de 2 x 25 ng d'ADN permet le criblage d'environ 10^7 génomes par réaction. Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, la variabilité des résultats de qPCR obtenus lors de notre étude. Cette variabilité pourrait également être expliquée par l'inoculum utilisé lors de ces premiers essais (environ 6.10^7 UFC). Afin de pallier cette fragilité de la qPCR, il pourrait être envisagé d'augmenter la quantité de bactéries donneuses inoculées sans toutefois dépasser les doses (10^9 à 10^{11} UFC par jour) utilisées pour l'administration de probiotiques (Wolvers et al. 2010). Une autre solution serait d'examiner les contenus intestinaux où les concentrations de la souche donneuse et d'éventuels transconjugants pourraient être plus élevées (en particulier au niveau du caecum). En effet, la composition bactérienne fécale ne reflète pas la composition des contenus intestinaux (Pang et al. 2012).

L'approche par cytométrie en flux a permis de quantifier de manière spécifique la souche DH5 α (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) dans la matrice testée. En utilisant une approche permettant d'analyser l'ensemble de la population cellulaire (protocole 1), le seuil de détection de la CMF était d'environ $1/10^4$ cellules analysées. Ce seuil de détection a pu être nettement amélioré ($1/10^9$ cellules) en limitant l'acquisition au seul signal fluorescent (seuil FL1), en concentrant les échantillons analysés et en prolongeant le temps d'acquisition (protocole 2). La détection par CMF du plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp1* dans les fèces des souris inoculées laisse envisager une utilisation de cette technique pour isoler et identifier les transconjugants, ce qui n'est pas possible avec la qPCR. En effet, un atout incontestable de la CMF est la possibilité de séparer les cellules d'intérêt, sur la base de fluorescence. Une sous-population mineure de cellules, telles que quelques transconjugants, diluée dans l'immensité d'un mélange complexe pourra ainsi être physiquement isolée par utilisation d'un trieur cellulaire (FACS – *fluorescence activated cell sorting*).

Pour effectuer un tri cellulaire, l'utilisation d'une souche possédant un double marquage fluorescent permet de séparer les bactéries donneuses des transconjugants. La mise au point d'une telle souche a été possible lors de ce travail. En effet, *E. coli* Δ *fli* (pB10::*rfp*) porte un marquage chromosomique *gfp* et plasmidique *rfp*. L'analyse de cette souche en CMF n'a pas permis de détecter la fluorescence rouge liée à la RFP plasmidique. Ceci pourrait être expliqué par une trop faible expression de la RFP par les cellules bactériennes après 24 heures de croissance. Cette hypothèse est toutefois peu probable, étant donné que la fluorescence rouge était visible en microscopie à épifluorescence après 24 heures d'incubation des souches. L'absence de détection de la fluorescence rouge liée à la RFP est plus probablement due au fait que la longueur d'onde du laser Argon, servant de source d'excitation des fluorochromes dans le cytomètre FACSCalibur (488 nm), n'est pas optimale pour la RFP (maximum d'excitation 558 nm). L'utilisation d'un cytomètre présentant un éventail plus large de longueur d'onde d'excitation est donc à envisager.

VI. Conclusion – perspectives

La stratégie expérimentale développée dans notre travail nous a permis de montrer qu'il était possible de suivre le devenir des souches donneuses et du plasmide pB10 dans les fèces des souris par qPCR. Cette méthode, bien qu'imparfaite, a également permis de mettre en évidence le transfert de pB10 au sein de la flore intestinale.

La CMF a permis de détecter le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp1* au sein de fèces. Pour ce qui concerne la détection de *E. coli* Δfli (pB10::*rfp*), nous avons été essentiellement confrontés à l'absence de la détection de la fluorescence rouge (RFP) *a priori* liée à la nature du cytomètre utilisé.

La stratégie expérimentale évaluée dans ce travail nécessite donc d'être optimisée avant d'être appliquée à un plus grand nombre d'animaux. Pour ce faire, il est notamment envisagé d'utiliser un inoculum plus important et d'utiliser, outre *E. coli* Δfli , une autre souche - *E. coli* MG1655* - connue pour ses capacités de colonisation. Dans cette perspective nous avons d'ores et déjà pu obtenir au sein de notre laboratoire un variant fluorescent de cette souche : *E. coli* MG1655*(pB10::*rfp*). Il est à souligner que le génome de *E. coli* MG1655* a été entièrement séquencé et qu'il a été montré qu'il existait une délétion d'environ 500 pb dans le gène *flhD* (impliqué dans la synthèse flagellaire) lui procurant une très bonne capacité de colonisation de l'épithélium intestinal. Cette délétion pourrait servir de cible pour dessiner des amorces et une sonde spécifiques permettant sa détection par qPCR. Un double marquage fluorescent de la souche serait également envisageable pour une détection en CMF.

Après optimisation d'un système de double marquage détectable en CMF, les bactéries fluorescentes pourront être isolées grâce à un trieur dans une solution ou sur des filtres. Ces bactéries pourront alors être soumises à une analyse basée sur l'utilisation d'une banque métagénomique de l'ADNr 16S permettant *in fine* d'étudier la diversité et la phylogénie des transconjugants (Sørensen et al. 2005).

VII. Bibliographie

- Adamczyk, M. & Jagura-Burdzy, G., 2003. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta biochimica Polonica*, 50(2), pp.425–53.
- Alauzet, C. et al., 2010. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), pp.60–4.
- Alauzet, C., 2009. Thèse : *Taxonomie des bactéries anaérobies: de la reclassification à la découverte des nouveaux pathogènes*. Université de Lorraine.
- Aminov, R.I., 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2(July), p.158.
- Ammor, M.S. et al., 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 14(1-3), pp.6–15.
- Arias, C.A. & Murray, B.E., 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 10(4), pp.266–78.
- Avrain, L., Vernozy-Rozand, C. & Kempf, I., 2004. Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *Journal of applied microbiology*, 97(1), pp.134–40.
- Bahl, M.I. et al., 2007. Conjugative transfer facilitates stable maintenance of IncP-1 plasmid pKJK5 in *Escherichia coli* cells colonizing the gastrointestinal tract of the germfree rat. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), pp.341–3.
- Bahl, M.I. et al., 2004. Effect of tetracycline on transfer and establishment of the tetracycline-inducible conjugative transposon Tn916 in the guts of gnotobiotic rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), pp.758–764.
- Bailey, M.T. et al., 2010. Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium*. *Infection and immunity*, 78(4), pp.1509–19.
- Baquero, F. & Cantón, R., 2009. Evolutionary Biology of Drug Resistance. In D. L. Mayers, ed. *Antimicrobial Drug Resistance SE - 1*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 9–32.
- Baquero, F., Tedim, A.P. & Coque, T.M., 2013. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Frontiers in microbiology*, 4, p.15.
- Barlow, M. et al., 2008. High rate of mobilization for *bla*CTX-Ms. *Emerging infectious diseases*, 14(3), pp.423–8.
- Barraud, O. & Ploy, M.-C., 2011. Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques : mise au point. *Journal des Anti-infectieux*, 13(3), pp.133–144.

- Bauernfeind, A., Grimm, H. & Schweighart, S., 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18(5), pp.294–8.
- Beaber, J.W., Hochhut, B. & Waldor, M.K., 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(6969), pp.72–4.
- Ben-Amor, K. et al., 2005. Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), pp.4679–89.
- Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), pp.1513–23.
- Blake, D.P. et al., 2003. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), pp.428–436.
- Boguslawska, J. et al., 2009. Intra- and interspecies conjugal transfer of Tn916-like elements from *Lactococcus lactis* in vitro and in vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), pp.6352–60.
- Bonot, S. et al., 2010. Improving the recovery of qPCR-grade DNA from sludge and sediment. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(6), pp.2303–11.
- Bonot, S., 2010. Thèse : *Persistance et dissémination du plasmide pB10, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines*. Université de Lorraine.
- Bonot, S. & Merlin, C., 2010. Monitoring the dissemination of the broad-host-range plasmid pB10 in sediment microcosms by quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology*, 76(1), pp.378–82.
- Bradley, D.E., Taylor, D.E. & Cohen, D.R., 1980. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 143(3), pp.1466–70.
- Breuil, J. et al., 1989. Transferable 5-nitroimidazole resistance in the *Bacteroides fragilis* group. *Plasmid*, 21(2), pp.151–4.
- Bush, K., 2013. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277, pp.84–90.
- Bush, K. & Jacoby, G.A., 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), pp.969–76.
- Cantón, R. & Coque, T.M., 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology*, 9(5), pp.466–75.
- Cantón, R., González-Alba, J.M. & Galán, J.C., 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in microbiology*, 3, p.110.

- Carlet, J. et al., 2012. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrobial resistance and infection control*, 1(1), p.11.
- Cerf-Bensussan, N. & Gaboriau-Routhiau, V., 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature reviews. Immunology*, 10(10), pp.735–44.
- Chart, H. et al., 2000. An investigation into the pathogenic properties of Escherichia coli strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. *Journal of applied microbiology*, 89(6), pp.1048–58.
- Chen, J. et al., 2000. Use of 16S rDNA Sequences as Signature Characters to Identify Xylella fastidiosa. *Current Microbiology*, 40(1), pp.29–33.
- Chen, Y.-T. et al., 2006. Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum-beta-lactamase activity in a clinical Klebsiella pneumoniae isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), pp.3861–6.
- Christensen, B.B., Sternberg, C. & Molin, S., 1996. Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from Aequorea victoria as a marker. *Gene*, 173(1 Spec No), pp.59–65.
- Clarke, M.B. et al., 2006. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), pp.10420–5.
- Clewell, D.B. et al., 1995. The conjugative transposon Tn916 of Enterococcus faecalis: structural analysis and some key factors involved in movement. *Developments in biological standardization*, 85, pp.11–7.
- Cordero, O.X. et al., 2012. Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6099), pp.1228–31.
- Dahl, K.H. et al., 2007. Transfer of plasmid and chromosomal glycopeptide resistance determinants occurs more readily in the digestive tract of mice than in vitro and exconjugants can persist stably in vivo in the absence of glycopeptide selection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(3), pp.478–86.
- De Gelder, L. et al., 2005. Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), pp.5309–17.
- Doré, J. & Corthier, G., 2010. [The human intestinal microbiota]. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 34 Suppl 1, pp.S7–15.
- Doucet-Populaire, F. et al., 1992. Conjugal Transfer of Plasmid DNA from Enterococcus faecalis to Escherichia coli in Digestive Tracts of Gnotobiotic Mice. *Microbiology*, 36(2), pp.502–504.

- Doucet-Populaire, F. et al., 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(1), pp.185–7.
- Dubnau, D., 1999. DNA uptake in bacteria. *Annual review of microbiology*, 53, pp.217–44.
- Dundas, N. et al., 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 10(4), pp.311–6.
- Duval-Iflah, Y. et al., 1980. R-plasmic transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* in vitro and in vivo in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. *Infection and immunity*, 28(3), pp.981–90.
- Duval-Iflah, Y., Maisonneuve, S. & Ouriet, M.F., 1998. Effect of fermented milk intake on plasmid transfer and on the persistence of transconjugants in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), pp.95–102.
- Eckburg, P.B. et al., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), pp.1635–8.
- Fabich, A.J. et al., 2011. Genotype and phenotypes of an intestine-adapted *Escherichia coli* K-12 mutant selected by animal passage for superior colonization. *Infection and immunity*, 79(6), pp.2430–9.
- Faure, S. et al., 2010. Transfer of plasmid-mediated CTX-M-9 from *Salmonella enterica* serotype Virchow to *Enterobacteriaceae* in human flora-associated rats treated with cefixime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), pp.164–9.
- Feld, L. et al., 2008. Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(4), pp.845–52.
- Fox, R.E. et al., 2008. Spatial structure and nutrients promote invasion of IncP-1 plasmids in bacterial populations. *The ISME journal*, 2(10), pp.1024–39.
- Francius, G. et al., 2011. Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of *Escherichia coli* cells subjected to osmotic stress. *PloS one*, 6(5), p.e20066.
- Frost, L.S. et al., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp.722–32.
- Frost, L.S. & Koraimann, G., 2010. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future microbiology*, 5(7), pp.1057–71.
- Gauger, E.J. et al., 2007. Role of motility and the flhDC Operon in *Escherichia coli* MG1655 colonization of the mouse intestine. *Infection and immunity*, 75(7), pp.3315–24.

- De Gelder, L. et al., 2005. Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), pp.5309–17.
- Gill, S.R. et al., 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* (New York, N.Y.), 312(5778), pp.1355–9.
- Gogarten, J.P. & Townsend, J.P., 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp.679–87.
- Gootenberg, D.B. & Turnbaugh, P.J., 2011. Companion animals symposium: humanized animal models of the microbiome. *Journal of animal science*, 89(5), pp.1531–7.
- Goren, M.G. et al., 2010. Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. *Emerging infectious diseases*, 16(6), pp.1014–7.
- Gruzza, M. et al., 1994. Study of gene transfer in vitro and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora. *Microbial releases : viruses, bacteria, fungi*, 2(4), pp.183–9.
- Guglielmini, J. et al., 2011. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS genetics*, 7(8), p.e1002222.
- Guo, X. et al., 2008. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in applied microbiology*, 47(5), pp.367–73.
- Haagensen, J.A.J. et al., 2002. In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS microbiology ecology*, 42(2), pp.261–8.
- Hartmann, A. et al., 2012. Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). *Frontiers in microbiology*, 3(March), p.83.
- Haug, M.C. et al., 2010. Construction and characterization of *Enterococcus faecalis* CG110/gfp/pRE25*, a tool for monitoring horizontal gene transfer in complex microbial ecosystems. *FEMS microbiology letters*, 313(2), pp.111–9.
- Haug, M.C. et al., 2011. Monitoring horizontal antibiotic resistance gene transfer in a colonic fermentation model. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(2), pp.210–9.
- Haut Conseil de Santé Publique, 2010. Recommandations relatives aux mesures à mettre en oeuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination–.
- Hawkey, P.M. & Jones, A.M., 2009. The changing epidemiology of resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64 Suppl 1, pp.i3–10.

- Hehemann, J.-H. et al., 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464(7290), pp.908–12.
- Hentges, D.J. et al., 1985. Protective role of intestinal flora against infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice: influence of antibiotics on colonization resistance. *Infection and immunity*, 47(1), pp.118–22.
- Heuer, O.E. et al., 2009. Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. , 49, pp.11–16.
- Ho, P.L. et al., 2011. Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PloS one*, 6(3), p.e17989.
- Hughes, D.T. et al., 2009. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS pathogens*, 5(8), p.e1000553.
- Igimi S, Ryu CH, Park SH, Sasaki Y, Sasaki T, K.S., 1996. Conjugal transfer of plasmid pAM beta 1 from *Lactococcus lactis* to mouse intestinal bacteria. *Lett Appl Microbiol.*, (23), pp.31–5.
- Huycke, M., Gilmore, M. & Jett, B., 1992. Transfer of pheromone-inducible plasmids between *Enterococcus faecalis* in the Syrian hamster gastrointestinal tract. *Journal of Infectious*, 5(166), pp.1188–91.
- Igimi S, Ryu CH, Park SH, Sasaki Y, Sasaki T, K.S., 1996. Conjugal transfer of plasmid pAM beta 1 from *Lactococcus lactis* to mouse intestinal bacteria. *Lett Appl Microbiol.*, (23), pp.31–5.
- Jacoby, G.A., 2009. *Antimicrobial Drug Resistance* in D. L. Mayers, ed., Totowa, NJ: Humana Press.
- Jacobsen, L. et al., 2007. Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS microbiology ecology*, 59(1), pp.158–66.
- Johnson J. L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, p.683-700. In Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A. and Krieg N. R. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Jones, B. V, 2010. The human gut mobile metagenome: a metazoan perspective. *Gut microbes*, 1(6), pp.415–31.
- Kalendar, R., Lee, D. & Schulman, A.H., 2011. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 98(2), pp.137–44.
- Kelly, B.G., Vespermann, A. & Bolton, D.J., 2009. Gene transfer events and their occurrence in selected environments. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(5), pp.978–83.
- Klare, I. et al., 1995. vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS microbiology letters*, 125(2-3), pp.165–71.

- Klimuszko, D. et al., 1989. Transfer of plasmid Hly in vivo in pigs intestine. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 12(1-2), pp.29–38.
- Król, J.E. et al., 2011. Increased Transfer of a Multidrug Resistance Plasmid in *Escherichia coli* Biofilms at the Air-Liquid Interface. *Applied and environmental microbiology*, 77(15), pp.5079–88.
- Kumarasamy, K.K. et al., 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, 10(9), pp.597–602.
- Lartigue, M.-F. et al., 2006. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(4), pp.1282–6.
- Launay, A. et al., 2006. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3), pp.1054–62.
- Laupland, K.B. et al., 2008. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *The Journal of infection*, 57(6), pp.441–8.
- Leatham, M.P. et al., 2005. Mouse intestine selects nonmotile flhDC mutants of *Escherichia coli* MG1655 with increased colonizing ability and better utilization of carbon sources. *Infection and immunity*, 73(12), pp.8039–49.
- Lester, C.H. et al., 2006. In vivo transfer of the vanA resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(2), pp.596–599.
- Lester, C.H., Frimodt-Moller, N. & Hammerum, A.M., 2004. Conjugal transfer of aminoglycoside and macrolide resistance between *Enterococcus faecium* isolates in the intestine of streptomycin-treated mice. *FEMS microbiology letters*, 235(2), pp.385–91.
- Licht et al., 1999. Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 9, pp.2615–22.
- Licht, T.R. et al., 2002. Transfer of the pheromone-inducible plasmid pCF10 among *Enterococcus faecalis* microorganisms colonizing the intestine of mini-pigs. *Applied and environmental microbiology*, 68(1), pp.187–193.
- Licht, T.R. et al., 2003. Evidence of increased spread and establishment of plasmid RP4 in the intestine under sub-inhibitory tetracycline concentrations. *FEMS microbiology ecology*, 44(2), pp.217–23.
- Licht & Wilcks, A., 2005. Conjugative gene transfer in the gastrointestinal environment. In *Advances in applied microbiology*. pp. 77–95.

- Lucet, J.-C. & Birgand, G., 2011. Les bacilles à Gram négatif multi-résistants : où va-t-on ? *Journal des Anti-infectieux*, 13(2), pp.122–132.
- Lupo, A., Coyne, S. & Berendonk, T.U., 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance : the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. , 3(January), pp.1–13.
- Magiorakos, A.-P. et al., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), pp.268–81.
- Marshall, B.M., Ochieng, D.J. & Levy, S.B., 2009. Commensals: Underappreciated Reservoir of Antibiotic Resistance. , 4(5), pp.231–238.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A. & Jacoby, G.A., 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351(9105), pp.797–9.
- Mater, D.D.G. et al., 2008. A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 14(1-3), pp.123–7.
- Mater, D.D.G. et al., 2005. Evidence of vancomycin resistance gene transfer between enterococci of human origin in the gut of mice harbouring human microbiota. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 56(5), pp.975–8.
- Merlin, C. et al., 2011. Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms. *Water research*, 45(9), pp.2897–905.
- Moubareck, C. et al., 2003. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(9), pp.2993–6.
- Musovic, S. et al., 2006. Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among gram-positive and gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*, 72(10), pp.6687–92.
- Nanchaiah, Y.V. et al., 2003. Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), pp.4846–52.
- Ngan, G.J.Y. et al., 2011. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. *Letters in applied microbiology*, 52(5), pp.546–54.
- Nielsen, K.M. & Townsend, J.P., 2004. Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature biotechnology*, 22(9), pp.1110–4.

- Nordstrom, L., Liu, C.M. & Price, L.B., 2013. Foodborne urinary tract infections : a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. , 4(March), pp.1–6.
- Normander, B. et al., 1998. Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Applied and environmental microbiology*, 64(5), pp.1902–9.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. & Groisman, E. a, 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), pp.299–304.
- Ogilvie, L. a, Firouzmand, S. & Jones, B. V, 2012. Evolutionary, ecological and biotechnological perspectives on plasmids resident in the human gut mobile metagenome. *Bioengineered bugs*, 3(1), pp.13–31.
- Pang, W. et al., 2012. Faecal and caecal microbiota profiles of mice do not cluster in the same way. *Laboratory animals*, 46(3), pp.231–6.
- Perichon, B. et al., 2000. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4416 is a VanD-type strain with an impaired D-Alanine:D-Alanine ligase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(5), pp.1346–8.
- Perichon, B., Reynolds, P. & Courvalin, P., 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(9), pp.2016–8.
- Perreten, V. et al., 1997. Antibiotic resistance spread in food. *Nature*, 389(6653), pp.801–2.
- Peterson, G. et al., 2011. Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. *Microbial pathogenesis*, 51(1-2), pp.1–8.
- Poirel, L., Héritier, C. & Nordmann, P., 2004. Chromosome-encoded Ambler class D β -lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), pp.348–351.
- Potron, A. et al., 2011. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(12), pp.E24–6.
- Radwan, M.M. et al., 2009. Biologically active cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *Journal of natural products*, 72(5), pp.906–11.
- Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M. & Handelsman, J., 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology*, 6(9), pp.981–9.
- Rolain, J.-M., 2013. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Frontiers in microbiology*, 4, p.173.

- Salyers, A., Gupta, A. & Wang, Y., 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in microbiology*, 12(9), pp.412–6.
- Salyers, A.A. & Shoemaker, N.B., 1995. Conjugative transposons: the force behind the spread of antibiotic resistance genes among *Bacteroides* clinical isolates. *Anaerobe*, 1(3), pp.143–50.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samuels, A.L., Lanka, E. & Davies, J.E., 2000. Conjugative junctions in RP4-mediated mating of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 182(10), pp.2709–15.
- Sansonetti, P. et al., 1980. Parameters controlling interbacterial plasmid spreading in a gnotoxenic chicken gut system: influence of plasmid and bacterial mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 17(3), pp.327–33.
- Schjørring, S. & Krogfelt, K., 2011. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *International journal of microbiology*, 2011, p.312956.
- Schjørring, S., Struve, C. & Krogfelt, K., 2008. Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(5), pp.1086–93.
- Schlüter, A. et al., 2003. The 64 508 bp IncP-1beta antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1beta group. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 11), pp.3139–53.
- Schmieder, R. & Edwards, R., 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future microbiology*, 7(1), pp.73–89.
- Sekirov, I. et al., 2008. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infection and immunity*, 76(10), pp.4726–36.
- SFHH, 2009. Prévention de la transmission croisée : précautions complémentaires contact.
- Skerman, V., 1989. *Approved Lists of Bacterial Names (Amended)*. V. Skerman, V. McGowan, & P. Sneath, eds., ASM Press.
- Sletvold, H. et al., 2010. Tn1546 is part of a larger plasmid-encoded genetic unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(9), pp.1894–906.
- Sommer, M.O. a & Dantas, G., 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. *Current opinion in microbiology*, 14(5), pp.556–63.
- Sommer, M.O. a, Dantas, G. & Church, G.M., 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5944), pp.1128–31.

- Sørensen, S.J. et al., 2003. Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and gfp as a reporter gene. *Current microbiology*, 47(2), pp.129–33.
- Sørensen, S.J. et al., 2005. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp.700–10.
- Sota, M. & Top, E.M., 2008. Host-specific factors determine the persistence of IncP-1 plasmids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), pp.1951–1954.
- Stecher, B. et al., 2012. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 582620.
- Stokes, H.W. & Gillings, M.R., 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), pp.790–819.
- Teng, L. et al., 2004. Identification of *Bacteroides thetaiotaomicron* on the basis of an unexpected specific amplicon of universal 16S ribosomal DNA PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), pp.1727–30.
- Thomas, C.M. & Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp.711–21.
- Thompson, C.L. et al., 2010. Community Dynamics in the Mouse Gut Microbiota : A Possible Role for IRF9-Regulated Genes in Community Homeostasis. , 5(4).
- Thompson, J.K. & Collins, M.A., 2003. Completed sequence of plasmid pIP501 and origin of spontaneous deletion derivatives. *Plasmid*, 50(1), pp.28–35.
- Toussaint, A. & Merlin, C., 2002. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid*, 47(1), pp.26–35.
- Trinh, S. et al., 1995. Plasmids plP419 and plP421 from *Bacteroides*: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements. *Microbiology*, 141, pp.927–935.
- Trinh, S., Haggoud, a & Reyssset, G., 1996. Conjugal transfer of the 5-nitroimidazole resistance plasmid pIP417 from *Bacteroides vulgatus* BV-17: characterization and nucleotide sequence analysis of the mobilization region. *Journal of bacteriology*, 178(23), pp.6671–6.
- Tuohy, K. et al., 2002. Monitoring transfer of recombinant and nonrecombinant plasmids between *Lactococcus lactis* strains and members of the human gastrointestinal microbiota in vivo--impact of donor cell number and diet. *Journal of applied microbiology*, 93(6), pp.954–64.

- Turnbaugh, P.J. et al., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), pp.1027–31.
- Valentine, P.J., Shoemaker, N.B. & Salyers, a a, 1988. Mobilization of Bacteroides plasmids by Bacteroides conjugal elements. *Journal of bacteriology*, 170(3), pp.1319–24.
- Van der Waaij, D., Berghuis-de Vries, J.M. & Lekkerkerk Lekkerkerk-v, 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *The Journal of hygiene*, 69(3), pp.405–11.
- Van der Waaij, L.A. et al., 1994. Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. *Cytometry*, 16(3), pp.270–9.
- Weiser, A.A. et al., 2013. Trace-Back and Trace-Forward Tools Developed Ad Hoc and Used During the STEC O104 : H4 Outbreak 2011. , 10(3).
- Wellington, E.M.H. et al., 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), pp.155–165.
- Wolters, D. et al., 2010. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *The Journal of nutrition*, 140(3), p.698S–712S.
- Wu, S. et al., 2010. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among Escherichia coli from pigs, pig carcasses and human. *Acta veterinaria Scandinavica*, 52, p.47.
- Xu, J. et al., 2007. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS biology*, 5(7), p.e156.
- Zaneveld, J.R., Nemergut, D.R. & Knight, R., 2008. Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 1), pp.1–15.
- Zhu, Y. et al., 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. , 110(9).
- Zoetendal, E.G. et al., 2002. Quantification of uncultured Ruminococcus obeum-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), pp.4225–32.

VU

NANCY, le 19 septembre 2013
Le Président de Thèse

NANCY, le 23 septembre 2013
Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur A. LOZNIEWSKI

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE N°6632

NANCY, le 30/09/2013

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Professeur P. MUTZENHARDT

RÉSUMÉ DE LA THÈSE :

L'émergence des bactéries multirésistantes constitue un défi croissant pour le contrôle des infections bactériennes. L'implication du microbiote intestinal dans la dissémination de gènes de résistance au sein du tube digestif est de plus en plus évidente. Cependant les acteurs et les mécanismes mis en jeu dans les transferts de gènes sont encore peu étudiés. Ce travail vise à mettre au point un modèle d'étude de transfert d'un plasmide dans le microbiote intestinal murin.

Deux méthodes de détection du plasmide (pB10) et de ses hôtes bactériens (*Escherichia coli* DH5α et *E. coli* Δ*fli*) ont été utilisées et comparées. L'une est basée sur la quantification spécifique des séquences ADN cibles par PCR quantitative. L'autre met en jeu des variants fluorescents énumérables par cytométrie en flux.

Ce travail a révélé qu'après inoculation par voie orale, le plasmide et ses bactéries vectrices restaient détectables dans les fèces pendant 3 jours (*E. coli* DH5α(pB10)) ou 15 jours (*E. coli* Δ*fli*(pB10)). Le transfert du plasmide vers des bactéries endogènes n'a pas été observé pour DH5α(pB10). Pour Δ*fli*(pB10), les résultats suggèrent une dissémination du plasmide chez les souris avec ou sans pression antibiotique.

Les résultats obtenus dans ce travail permettront de mettre en place un modèle optimisé pour la détection de transfert de gènes au sein du microbiote intestinal murin.

TITRE EN ANGLAIS:

Development of a protocol for plasmid transfer detection in the gastrointestinal tract of mice.

THÈSE : MEDECINE SPECIALISÉE – ANNÉE 2013

MOTS CLEFS : résistance, antibiotiques, plasmide, transfert de gènes, conjugaison, intestin.

INTITULÉ ET ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
