

Titre : Etude de l'implication du système d'efflux *EmrAB* dans la multirésistance chez *Salmonella enterica* Typhimurium**Auteurs :** Koné A. Z. ^{1*}; Baucheron S²., Cloeckaert A²., Goudeau A³. ; Rasschaert D³.¹ Laboratoire National de la Santé, Bamako Mali² INRA de Tours-Nouzilly, UR 086 Bio-Agresseurs Santé, Environnement France³ Université François Rabelais, Faculté de Médecine de Tours France* Auteur de correspondance : azkone@hotmail.com ou ngolona@gmail.com**Résumé**

Salmonella est un responsable majeur des cas de toxi-infection d'origine alimentaire. Malgré la diminution de l'incidence des salmonelloses ces dernières années, une augmentation du nombre des souches résistantes aux antibiotiques est observée. La résistance simultanée à plusieurs familles d'antibiotiques est particulièrement importante chez le sérotype Typhimurium de lysotype DT104. La résistance multiple est due à des mécanismes spécifiques associés et au mécanisme d'efflux actif plurispécifique. L'efflux permet à la bactérie de diminuer sa concentration intracellulaire en composés toxiques et ainsi de survivre dans un environnement hostile. Chez les entérobactéries, parmi les différents transporteurs identifiés, AcrB joue un rôle important dans la résistance multiple en fonctionnant en système d'efflux tripartite AcrAB-TolC. Cependant, chez *S. Typhimurium*, un autre transporteur que AcrB semble jouer un rôle important, en association avec TolC, dans la résistance aux sels biliaires. EmrB, un transporteur de la famille MFS pourrait jouer ce rôle, ainsi, des mutants inactivés au niveau du gène *emrB* et du gène codant le régulateur transcriptionnel, *emrR* ont été construits. Les tests de sensibilité aux antibiotiques et aux sels biliaires n'ont pas montré de différence significative entre la souche parentale et les mutants. La complémentation avec le gène *emrB* n'a pas permis d'amplifier le fragment attendu, pour chacun des clones testés.

Mots clés: *Salmonella*, multirésistance, système d'efflux, opéron *emrRAB*

Title : Role of the efflux system EmrAB in multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium**Abstract**

Salmonella is a major contributor of cases of food-borne outbreak. Despite the decrease in the incidence of salmonellosis in recent years, an increase in the number of strains resistant to antibiotics is observed. Simultaneous resistance to several families of antibiotics is particularly important among serotype Typhimurium phage type DT104. Multiple resistance is due to associated specific mechanisms and the multi-species active efflux mechanism. Efflux allows the bacterium to reduce its intracellular concentration of toxic compounds and thus to survive in a hostile environment. In enteric bacteria, among the different carriers identified, AcrB plays an important role in the multiple resistance running in system of tripartite efflux AcrAB-TolC. However, in *S. Typhimurium*, another carrier than Cbra appears to play an important role in association with TolC in resistance to bile salts. EmrB, a carrier of the MFS family could play this role, thus, mutants inactivated at the level of the *emrB* gene and transcriptional regulator gene, *emrR* were built. Tests of susceptibility to antibiotics and bile salts have not shown significant differences between the parental strain and mutants. The complementation with the *emrB* gene did not amplify the fragment whereas, for each of the clones tested.

Keys works: *Salmonella*, multidrug resistance, efflux system, operon *emrRAB*

I. INTRODUCTION

Les bactéries à Gram négatif sont naturellement plus résistantes aux antibiotiques que celles à Gram positif puisqu'elles sont pourvues d'une membrane externe peu perméable [1]. En plus des lipopolysaccharides de surface (LPS) formant une barrière efficace contre certaines molécules toxiques, les bactéries ont la capacité de rejeter dans le milieu extérieur différentes substances toxiques [2], [3]. Ainsi, le mécanisme d'efflux permet de maintenir une concentration sub-inhibitrice en antibiotique dans la cellule bactérienne. La résistance intrinsèque générale des bactéries Gram négatif est déterminée par la présence de pompes à large spectre de substrats dites «multidrogues» [1], [3]. Lorsque les niveaux d'expression des systèmes d'efflux constitutifs augmentent ou lorsque les systèmes d'efflux normalement réprimés deviennent exprimés, la résistance aux antibiotiques peut atteindre des niveaux élevés [4], [5]. Le rôle de l'efflux dans les mécanismes de résistance a été décrit la première fois, à la fin des années 1970, pour la résistance aux tétracyclines. Aujourd'hui, ce mécanisme de résistance est décrit chez de nombreuses espèces bactériennes et pour de nombreux antibiotiques. Les transporteurs bactériens

impliqués dans l'efflux sont décrits [2], [5]. La spécificité des pompes d'efflux est variable selon les familles de transporteurs, toutes celles de la famille RND sont plurispécifiques, elles sont donc nommées transporteurs multidrogues [6]. Les transporteurs appartenant à la famille MFS peuvent aussi être des transporteurs multidrogues [5], comme le transporteur *EmrB* de *E. coli*, auquel nous sommes intéressés.

L'objectif de notre étude était de montrer si la pompe d'efflux *EmrAB* joue un rôle dans la résistance aux sels biliaires chez *S. Typhimurium*. Une étude du système d'efflux *AcrAB-TolC* chez *S. Typhimurium* DT104 a mis en évidence : i) son rôle essentiel dans la résistance multiple aux antibiotiques et en particulier aux quinolones [7] ; ii) le rôle majeur du canal *TolC* et le rôle mineur du transporteur *AcrB* dans la résistance aux sels biliaires et aux détergents mais aussi dans la virulence [8].

Ces résultats nous ont conduit à supposer que d'autres transporteurs que *AcrB* sont impliqués dans la résistance aux sels biliaires et aux détergents et interagissent avec *TolC*. Un des candidats est le transporteur *EmrB*. Comme il a été décrit ci-dessus, chez *E. coli*, *EmrB* peut

fonctionner avec TolC pour expulser de nombreux composés toxiques [9], [5]. De plus, *EmrB* pourrait jouer un rôle dans la résistance aux sels biliaires, en complément du système *AcrAB* [10].

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la recherche sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques et particulièrement sur les cibles permettant d'inhiber les mécanismes d'efflux.

II. METHODOLOGIE

La méthodologie a été basée sur la délétion du gène *emrB* codant pour le transporteur et du gène de son répresseur local *EmrR* [11]. La sensibilité des mutants à différents agents antimicrobiens a été mesurée par des antibiogrammes et par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les mutants obtenus ont été complétés par un plasmide portant le gène *emrB*.

1. Les Plasmides et la souche bactérienne

Les plasmides pKD4 (thermosensible et portant une cassette de résistance à la kanamycine), pKD46 (favorisant la recombinaison, résistant à l'ampicilline) et pBR1MCS-4 (plasmide de clonage à faible copie, résistant à l'ampicilline) ont été utilisés.

Salmonella enterica sérovar Typhimurium DT104 S/92 1495 a été la

souche utilisée. Elle a été isolée en 1992 en Ecosse chez le bovin. Elle était sensible à de nombreux antibiotiques et utilisée pour la construction des mutants.

2. Les milieux et réactifs

Les milieux et réactifs suivants ont été utilisés :

- Milieu Brain-Heart-Infusion (BHI): Extrait de cerveau, de cœur et peptones 27,5 g/l; D (+)glucose 2 g/l; NaCl 5 g/l; NaH₂PO₄ 2,5 g/l
- Milieu Luria-Bertani (LB) : Extrait de levure 5 g/l; Bactotryptone 10 g/l; NaCl 10 g/l
- Milieu Mueller-Hinton (MH): Infusion de viande 2 g/l; Hydrolysate de caséine 17,5 g/l; Amidon 1,5 g/l.
- Bouillon GYT : Glycérol 10 %, Extrait de levure 0,125 %, Tryptone 0,25 %
- Bouillon SOB : Tryptone 20 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM (pH7)
- Bouillon SOC : SOB + 0,5 % MgCl₂ 2 M stérile + 2 % Glucose 1 M stérile
- L-arabinose : Solution 1 M ajoutée à 1 % au bouillon LB afin d'obtenir 1 mM final
- Solution de Xgal (40 mg/L) et d'IPTG (100 mM)
- Antibiotiques (Tableau I) : Les disques d'antibiotiques utilisés ont été : Ampicilline, Chloramphénicol, Florfénicol, Streptomycine, Spectinomycine, Sulfamide, Tétracycline, Triméthoprime, Gentamicine, Kanamycine, Néomycine,

Cefalexine, Ceftiofur, Ceftriaxone, Ceftazidime, Azithromycine, Ciprofloxacine, Enrofloxacin, Marbofloxacine, Fluméquine et Acide nalidixique .

- Sels biliaires : nous avons utilisé : le Désoxycholate de Sodium (DOC) et le Choléate de Sodium (CHOL) en solution de 800 à 51200 mg/l.

- Détergent : Dodécylsulfate de Sodium (SDS) en solution de 800 à 51200 mg/l a été le seul détergent utilisé.

- Amorces : Plusieurs amorces ont été utilisées (voir tableau II) pour la réalisation des PCR.

3. Construction des mutants : délétion de *emrB* ou *emrR*

La méthode utilisée pour la construction des mutants était basée sur la technique de Datsenko et Wanner [11]. Elle a consisté à l'inactivation du gène à muter par délétion. La stratégie a été de remplacer, par recombinaison, une séquence chromosomique par un gène de résistance à la kanamycine (*kan*) qui était généré par PCR, grâce à des amorces (P1, P2) portant des extensions homologues (H1, H2) au gène cible. Le produit PCR ainsi obtenu a été introduit par électroporation chez la souche à muter, celle-ci portant un plasmide (pKD46) favorisant la recombinaison du fragment PCR et de la

séquence cible. Après sélection, le gène de résistance a été éliminé.

3.1 Préparation des ADN plasmidiques

Les ADN plasmidiques pKD4 et pKD46 ont été extraits avec le Kit SV Wizard Plus minipreps (Promega). La qualité et la quantité des ADN extraits ont été appréciées sous ultraviolets après électrophorèse sur un gel contenant 0,8 % d'agarose et 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET). Le dépôt simultané de marqueur de poids moléculaire (SmartLadder, Eurogenetec) permettait le contrôle de la taille et l'estimation de la quantité d'ADN extraite.

3.2 Amplification de la cassette de résistance à la kanamycine

Les amorces utilisées sont répertoriées sur le tableau II. Les réactions de PCR ont été réalisées selon le programme suivant: Dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, 30 Cycles d'amplification comprenant chacun, dénaturation de 0,5 min à 94°C; hybridation de 0,5 min à la température précisée dans le tableau II selon les amorces; élongation de 1,5 min à 72°C Élongation finale de 7 min à 72°C et Conservation à 4°C.

La qualité du produit PCR obtenu a été vérifiée par électrophorèse (environ 1 h à 90 Volts) en gel d'agarose chargé de BET, comparativement au marqueur de taille Smart Ladder.

La PCR permettant d'amplifier le gène *kan* puis d'inactiver le gène *emrB* a été réalisé avec l'ADN matrice pKD4. La PCR permettant l'inactivation du gène *emrR* a été réalisée dans les mêmes conditions, mais avec les amorces correspondantes, *emrR-P2* et *emrR-P1*.

3.3 Transformation des souches de *Salmonella*

La souche de *S. Typhimurium* DT104 S/92 1495 ont été transformée avec le plasmide pKD46 par électroporation. De même la souche *S. Typhimurium* DT104 S/92 1495 + pKD46 l'ont été avec chacun des deux produits PCR. L'incubation était réalisée à 30°C pour les transformants avec pKD46 et à 37°C pour les transformants avec le produit PCR, pendant 2-3 h, puis prolongée une nuit à la température ambiante. La culture à 37°C permettait d'éliminer le plasmide pKD46 et de favoriser la recombinaison. Après la première électroporation, les transformants ont été sélectionnés à 30°C en gélose BHI, en présence de 100 mg/l d'ampicilline (présence de pKD46). Après la deuxième électroporation, les transformants ont été sélectionnés en gélose BHI, en présence de 50 mg/l de kanamycine. Les mutants ont été ensuite testés pour leur sensibilité à l'ampicilline afin de vérifier la perte du plasmide pKD46. Tous les clones Kan^R et Ampⁱ^R ont été alors conservés. Chaque fois des clones Ampⁱ^R + Kan^R ont été obtenus,

ils étaient maintenus sur milieu non sélectif à 43°C afin d'éliminer pKD46, puis un nouveau test de sensibilité à l'ampicilline permettrait de vérifier la perte de ce plasmide.

4. Contrôle des mutants obtenus

4.1 Vérification de la délétion des gènes *emrB* et *emrR*

Les amorces *emrB1* et *emrB2* (Tableau II) internes au gène *emrB* mais externes à la partie délétée ont été utilisées pour le contrôle des mutants obtenus. Les amorces *emrR1* et *emrR2* (Tableau II) ont été utilisées pour contrôler les mutants inactivés au niveau du gène *emrR*. La PCR a été réalisée directement à partir des colonies bactériennes isolées sur gélose de sélection.

4.2 Vérification de la présence du gène de résistance à la kanamycine

Les amorces *k2* et *kt* (Tableau II), internes à *kan*, ont été utilisées pour détecter la présence du gène *kan*.

4.3 Sensibilité aux antibiotiques, sels biliaires et détergents

Suivant les recommandations du Comité de l'Antibiotiques de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) [12], les antibiogrammes ont été réalisées selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les disques d'antibiotiques utilisés étaient déposés à la surface d'un milieu MH, préalablement ensemencé par inondation avec une dilution de la souche à tester. Après 18 h d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition était comparé aux

valeurs critiques publiées [12] (Tableau I) ou par les firmes produisant les antibiotiques à usage vétérinaire. L'interprétation des résultats a permis de classer les souches bactériennes en souches sensibles (S), résistantes (R) ou intermédiaires, comparativement aux valeurs critiques (Tableau I).

La détermination de la CMI a permis d'évaluer la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber *in vitro* toute croissance visible de la souche à étudier. Les CMI des sels biliaires et détergents ont été déterminés en microplaque, en bouillon LB.

La CMI a été déterminée par la plus faible concentration d'antibactérien ne présentant pas de trouble.

5. Complémentation des mutants

Le mutant délété de *emrB* était complété à l'aide d'un plasmide portant les gènes *emrA* et *emrB*, sous contrôle du même promoteur.

5.1 Préparations des cellules bactériennes

Les cellules électrocompétentes utilisées pour les expériences de complémentation ont été préparées à partir de culture du mutant S/92 1495 Δ *emrB::kan*.

5.2 Préparation de l'insert

Il s'agissait d'amplifier les gènes *emrA* et *emrB* d'après Mc Clelland *et al.*, [13] et de créer des extrémités cohésives avec le vecteur. A l'extrémité 5' de la séquence de chacune des amorces choisies était ajoutée

la séquence palindromique d'une enzyme de restriction absente dans *emrA* et *emrB* mais présente dans le vecteur, soient *SacI* et *EcoRI*.

L'ADN matrice correspondait à l'ADN chromosomique de la souche parentale S/92 1495, était extrait à l'aide du QIAmp DNA Mini kit (Qiagen). La PCR a été réalisée et le produit d'amplification a été purifié avec le kit NucleoSpinExtract (Macherey-Nagel). La digestion du produit PCR est ensuite réalisée avec les enzymes *EcoRI* et *SacI* pendant 2 h à 37°C. Les enzymes sont inactivées pendant 20 min à 65°C. La concentration est évaluée par électrophorèse.

5.3 Préparation du vecteur pBR1MCS-4

L'extraction de l'ADN a été réalisée avec le kit Plasmid Midi purification (Qiagen) à partir d'une culture de la nuit en bouillon BHI en présence de 100 mg/l d'ampicilline. Le plasmide extrait a été digéré par *EcoRI* et *SacI* pendant 2 h à 37°C. Les enzymes ont été ensuite inactivées 20 min à 65°C. La concentration d'ADN a été évaluée par électrophorèse.

5.4 Ligation et transformation des cellules

L'insert *emrAB* et le plasmide pBR1MCS-4 digérés ont été collés selon le ratio quantitatif 3/1, en présence de ligase (Promega) pendant une nuit à 4°C. Le produit de ligation (pEmrAB) a été conservé à -20 °C. L'électroporation a été

réalisée à partir des cellules électro-compétentes S/92 1495 $\Delta emrB::kan$.

5.5 Sélection des souches complémentées des gènes *emrAB*

Les transformants complémentés ont été sélectionnés à 37°C sur la gélose BHI en présence de 10 mg/l d'ampicilline, de 40 mg/ml de Xgal et 100 mM d'IPTG. Les colonies blanches, correspondant aux mutants ayant intégré le plasmide avec l'insert, ont été repiquées sur du bouillon LB en présence d'ampicilline à 100 mg/l.

5.6 Contrôle des mutants complémentés

Une première PCR avait permis de vérifier, chez les mutants complémentés présélectionnés, la présence du gène *emrB*. Une autre PCR avait permis de vérifier, chez les mutants complémentés présélectionnés, l'intégration de l'insert, en amplifiant le site de clonage qui comportait les multiples séquences de restriction. Les amorces M13F et M13R utilisées (Tableau IV) permettaient l'amplification d'un fragment de 200 pb pour le plasmide pBR1/MCS-4, contre 3000 pb, à partir du plasmide extrait chez les mutants complémentés.

5.7 Sensibilité aux antibiotiques, sels biliaires et détergents des mutants complémentés

Les mesures de sensibilité par antibiogramme ou CMI permettaient d'observer si la complémentation a

restauré le fonctionnement de la pompe d'efflux, donc si la sensibilité diminuait.

III. RESULTATS

1- Analyse de la séquence de l'opéron *emrRAB* chez *S. Typhimurium* LT2

La séquence de l'opéron *emrRAB* de *S. Typhimurium* LT2 est disponible dans les bases de données [13] et elle présente une forte homologie (83 %) avec celle de *E. coli*. Le locus *emrR* comprend 531 pb, le locus *emrB* 1539 pb et le locus *emrA* 1173 pb. Nous retrouvons les mêmes motifs dans la région du promoteur, en amont de *emrR*, incluant le site de fixation de EmrR.

2- Obtentions des mutants

2.1 Mutants *emrB*

Nous obtenions les mutants inactivés par délétion du gène *emrB* et remplacement de ce gène par une cassette de résistance à la kanamycine. Les mutants ainsi obtenus étaient notés S/92 1495 $\Delta emrB::kan$. Après purification, la concentration du produit PCR était de 40 ng/ μ l. La transformation des cellules électrocompétentes de *S. Typhimurium* S/92 1495 a été faite avec 3 μ l de ce produit, soit 120 ng d'ADN. La sélection sur gélose en présence de 50 mg/ml de kanamycine a produit 400 clones.

2.2 Mutants *emrR*

Les mutants par inactivation du gène *emrR* ont été obtenus de la même façon que ceux

du gène *emrB*, ils étaient notés S/92 1495 Δ *emrR::kan*. La concentration du produit PCR purifié était de 2 μ g/ μ l, 3 μ l de ce produit ont servi à la transformation des cellules électrocompétentes. Le rendement de la transformation après la sélection a été de 13 clones pour 6 μ g.

3- Contrôle des clones obtenus

3.1 Vérification de la délétion

Pour le contrôle des clones obtenus, les PCR permettant la vérification du remplacement de *emrB* ou *emrR* par *kan* ont été réalisées. Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 9 et 10. Les tailles attendues et obtenues sont 1666 pb pour les mutants S/92 1495 Δ *emrB::kan* et 995 pb pour la souche parentale (Figure 1A). Les résultats obtenus sont 1580 pb pour les mutants S/92 1495 Δ *emrR::kan* et 399 pb pour la souche sauvage (Figure 1B).

3.2 Vérification de la présence du gène de résistance à la kanamycine

La présence du gène *kan*, détectée par un fragment de 471 pb, a été confirmée chez les mutants S/92 1495 Δ *emrB::kan* (Figure 2A) et S/92 1495 Δ *emrR::kan* (Figure 2B). L'absence de ce gène a été aussi confirmée puisqu'il n'y a aucune amplification chez la souche parentale (Figures 2A et 2B).

3.3 Mesures de sensibilité des clones obtenus

Les mesures des diamètres d'inhibition des mutants (*emrB* et *emrR*) sont présentées

sur le tableau III. Les antibiogrammes réalisés sur les clones sélectionnés n'ont pas montré de différence significative entre les mutants S/92 1495 Δ *emrB::kan* et la souche sauvage S/92 1495, sauf pour la kanamycine et la néomycine, confirmant la présence du gène *kan*. En revanche, nous avons noté une petite augmentation de la résistance aux quinolones Nal et Flu après délétion de *emrR*. Les résultats des CMI des sels biliaires (CHOL et DOC) et du détergent (SDS) sont présentés sur le tableau IV. Les éventuelles différences observées n'étaient pas significatives puisqu'elles étaient inférieures à un facteur de 4 fois la CMI. Ces mesures ont montré que les gènes *emrB* et *emrR* n'étaient pas des acteurs majeurs dans la résistance de *Salmonella* aux sels biliaires et aux détergents.

4- Complémentation des mutants par le plasmide pBR1MCS-4

L'extrait d'ADN plasmidique (pBR1MCS-4) avait une concentration d'environ 40 ng/ μ l. Après la digestion par *EcoRI* et *SacI*, nous avons vérifié la taille et la pureté des fragments qui étaient de 4950 pb pour le vecteur et 2930 pb pour l'insert (Figure 3). Après la ligation puis la transformation, nous avons obtenu plus de 500 clones. Ces clones sélectionnés sur gélose BHI en présence d'ampicilline, de Xgal et d'IPTG étaient tous des colonies

blanches, c'est à dire des mutants ayant intégré le plasmide avec l'insert.

4.1 Contrôle des mutants complémentés

L'amplification de *emrB* avait pour but de vérifier la présence de ce gène chez les mutants S/92 1495 Δ *emrB::kan* complémentés. Les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisants. Nous n'avions pas pu obtenir d'amplification à partir de cette réaction.

4.2 Mesures de sensibilité des clones obtenus

A partir des amorces M13, nous n'avions pas pu amplifier le fragment attendu, pour chacun des clones à tester. Par conséquent les tests de sensibilité aux antibiotiques, sels biliaires et détergents des clones obtenus n'ont pas été réalisés.

IV. DISCUSSION

L'utilisation des antibiotiques, tant en élevage qu'en médecine humaine, a favorisé la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques thérapeutiques. La surveillance de l'évolution de ces résistances a montré que les salmonelles responsables des Tiac, en particulier *S. Typhimurium* DT104, sont devenues résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques. La connaissance des mécanismes de résistances est devenue un élément indispensable à la prévention de la diffusion de telles bactéries et à la

prévention des risques d'échec thérapeutique. Ainsi, il a été mis en évidence chez *Salmonella* que le mécanisme d'efflux actif, et en particulier le système AcrAB-TolC, est en grande partie responsable de la résistance multiple aux antibiotiques [7]. En revanche, TolC joue un rôle majeur et AcrB un rôle mineur dans la résistance aux sels biliaires et détergents, ainsi que dans la colonisation intestinale et la virulence de *S. Typhimurium* chez le poussin [8]. Nous avons alors étudié le rôle potentiel du transporteur *EmrB* dans ces résistances.

La première étape de notre démarche était la construction de mutants délétés au niveau du gène *emrB* ou du gène *emrR*. Nous avons choisi une technique de mutagenèse simple et rapide qui permet de bien cibler la délétion se produisant par recombinaison entre le gène chromosomique et le produit PCR, préalablement généré et contenant le gène de résistance à la kanamycine. La souche *S. Typhimurium* S/92 1495 utilisée dans l'étude est une souche sensible qui permet de sélectionner facilement les mutants sur le critère de résistance à la kanamycine.

Après la vérification des constructions par PCR, nous avons mesuré la sensibilité des mutants aux antibiotiques, sels biliaires et détergents, comparativement à la souche parentale. L'inactivation de *emrR* a conduit

à une augmentation de la résistance aux quinolones telles que la fluméquine et l'acide nalidixique, confirmant le rôle de *EmrAB* dans cette résistance [2]; [5]; [14]; [15]; [3]. Les valeurs de CMI des sels biliaires ou du détergent étaient très élevées (de 25600 à > 51200 mg/l) et n'étaient pas significativement différentes entre la souche sauvage et les mutants *emrB* ou *emrR*. Ainsi, les mutants expérimentaux obtenus avaient permis d'identifier que le système *EmrAB* était peu ou pas impliqué dans la résistance aux sels biliaires et détergents chez *S. Typhimurium*, comme le montre Sulavik *et al* [16] chez *E. coli*. Pourtant ce système d'efflux *EmrAB* est démontré par Thanassi *et al.*, [10] comme impliqué dans la résistance chez *E. coli*, en complément de *AcrAB*.

Pour compléter cette démarche, il serait intéressant de transférer la délétion de *emrB* ou *emrR* chez des souches résistantes à des antibiotiques tels que les fluoroquinolones. De telles souches chez lesquelles un ou plusieurs systèmes d'efflux sont surexprimés, permettraient éventuellement d'observer une différence de CMI entre souche parentale et mutants.

La deuxième étape de notre démarche était alors la complémentation, avec le locus *emrAB* sur support plasmidique, de la souche parentale et des mutants délétés *emrB* ou *emrR*.

Les vérifications par PCR des clones S/92 1495 Δ *emrB::kan* complémentés par *emrAB* n'avaient pas permis de mettre en évidence la présence du plasmide avec l'insert *emrAB*. Ces vérifications devraient être poursuivies pour tous les clones obtenus. En effet, il serait intéressant de savoir si la surexpression de ce système conduit à une augmentation du niveau de résistance.

Toutefois, ces résultats nous orientent plutôt à explorer le rôle d'autres pompes d'efflux notamment celles de la famille RND. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de telles pompes, le PA β N, s'est avéré efficace pour diminuer la résistance aux sels biliaires et aux détergents [7], [8].

Chez *S. Typhimurium* comme chez de nombreuses autres bactéries, les pompes d'efflux confèrent un moyen d'adaptation à un environnement hostile, elles pourraient donc constituer une cible intéressante pour le développement de nouveaux antibiotiques. La connaissance de ces pompes d'efflux impliquées dans la résistance, de leur fonctionnement et de leur régulation a une importance capitale pour lutter contre la résistance aux antibiotiques thérapeutiques. De plus, le développement d'inhibiteurs de pompes d'efflux utilisés en association avec les antibiotiques permettrait de diminuer la résistance acquise ainsi que l'émergence de souches résistantes et permettrait ainsi

d'augmenter l'efficacité des antibiotiques utilisés actuellement.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Jean François VAUTHEROT, directeur de l'unité de BASE de l'INRA de Tours-Nouzilly, la Direction du Laboratoire Central Vétérinaire de Bamako, le Comité National de la Recherche Agronomique et le Service de la Coopération et d'Action Culturelle de l'ambassade de France à Bamako. Ils s'adressent leur profonde reconnaissance à Jean François BELIERES, René POCCARD-CHAPSUS, Françoise TARDO-DINO, Nadine GAUDIN et Patricia CHEIKHE. Nos remerciements vont aussi à tous les membres de l'équipe "résistance aux antibiotiques".

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hancock R. E. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology*. 5:37-42.
2. Borges-Walmsley M. I., K. S. McKeegan and A. R. Walmsley. 2003a. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal* 376:313-338.
3. Putman M., H. W. Van Veen and W. N. Konings. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:672-693.
4. Grkovic, S., M. H. Brown and R. A. Skurray. 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66:671-701.
5. Li X. Z. and H. Nikaido. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64: 159-204.
6. Poole K. 2000. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:2233-2241.
7. Baucheron S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla and A. Cloeckaert. 2004. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:3729-3735
8. Baucheron S., C. Mouline, K. Praud, E. Chaslus-Dancla and A. Cloeckaert. 2005. TolC but AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonisation of chicks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55 :707-712.
9. Borges-Walmsley M. I, J. Beauchamp, S. M. Kelly, K. Jumel, D. Candlish, S. E. Harding, N. C. Price, A. R. Walmsley. 2003b. Identification of oligomerization and drug-binding domains of the membrane fusion protein EmrA. The

Journal of Biological Chemistry
278(15):12903-12912.

10. Thanassi D. G., L. W. Cheng and H. Nikaido. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 179:2512-2518.

11. Datsenko K. A. and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:6640-6645.

12. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM). Communiqué 2005.

13. McClelland M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea,

W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston and R. K. Wilson. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature 413: 852-856.

14. Lomovskaya O. and K. Lewis. 1992. *emr* an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89:8938-8942.

15. Nikaido H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology 178:5853-5859.

16. Sulavik M. C., C. Houseweart, C. Cramer, N. Jiwani, N. Murgolo, J. Greene, B. DiDomenico, K. J. Shaw, G. H. Miller, R. Hare and G. Shimer. 2001. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45:1126-1136.

Tableau I. Concentrations et diamètres critiques pour *Enterobacteriaceae* (d'après CA-SFM, Communiqué 2005)

Antibiotiques	Charge du disque	Diamètre critique (mm)		Concentration critique (mg/l)	
		S	R	S	R
Ampicilline	10 µg	≥ 19	< 14	≤ 4	> 16
Chloramphénicol	30 µg	≥ 23	< 19	≤ 8	> 16
Florfénicol	30 µg	≥ 19	< 13	≤ 13	> 19
Streptomycine	500 µg	≥ 14	< 12	≤ 250	> 500
Spectinomycine	100 µg	≥ 20	< 20	≤ 64	> 64
Sulfamide	200 µg	≥ 17	< 12	≤ 64	> 256
Tétracycline	30 UI	≥ 19	< 17	≤ 4	> 8
Triméthoprim	5 µg	≥ 16	< 12	≤ 4	> 8
Gentamicine	500 µg	≥ 14	< 10	≤ 250	> 500
Kanamycine	1000 µg	≥ 14	< 10	≤ 250	> 500
Néomycine	30 UI	≥ 17	< 15	≤ 8	> 16
Cefalexine	30 µg	≥ 18	< 12	≤ 8	> 32
Ceftiofur	30 µg	≥ 21	< 15	≤ 4	> 32
Ceftriaxone	30 µg	≥ 21	< 15	≤ 4	> 32
Ceftazidime	30 µg	≥ 21	< 15	≤ 4	> 32
Azithromycine	15 µg	≥ 22	< 17	≤ 0,5	> 4
Ciprofloxacine	5 µg	≥ 25	< 22	≤ 0,5	> 1
Enrofloxacin	5 µg	≥ 24	< 21	≤ 0,5	> 1
Marbofloxacine	5 µg	≥ 25	< 22	≤ 0,5	> 1
Fluméquine	30 µg	≥ 25	< 21	≤ 4	> 8
Acide nalidixique	30 µg	≥ 20	< 15	≤ 8	> 16

Tableau II. Oligonucléotides utilisés dans les réactions PCR

Amorces	Séquences (5' - 3')	Température d'hybridation	Taille (pb) produit PCR
emrB-P1	GTGCAGGGCGTGGTCGCCGGGCC GCTGATTCCGCTCTCGCAAAGCCT GTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52	1600
emrB-P2	CATAGTGGTGGTAATCGAGGTGCC GATGGAACCTGCCAGCGTTCGCGT GACATATGAATATCCTCCTTAG		
emrB1	CAGCAGCCTGAATATGCTGA	59	995 (WT)
emrB2	GAGCATGGTGTAGCGACTCA		1666 (mutant)
emrR-P1	TTCGCGCCAGCCGTCACGAAGACT TTCCTTATCAGGAAATTCTTTTGAC TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52	1600
emrR-P2	GTGCTCAAGTTGATCTTTTTTCGGCT GTGCTAAGTGATGACCAGAGTTGA TCATATGAATATCCTCCTTAG		
emrR1	ATCAAGACGCGTCAGGAGTT	59	399 (WT)
emrR2	AGTTCGTTTACGCCATTGA		1580 (mutant)
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	62	471
kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC		
EcoRIemrAB 1	CTCGAATTCTACTGCTGGCCTTTCT GACA	53	2930
SacIemrAB2	CTCGAGCTCTTCATGGGTAGAGGC CAATC		
M13F	TCGTGACTGGGAAAAC	55	200 (vide)
M13R	GTCATAGCTGTTTCCTG		3000 (+insert)

Tableau III. Résultats des antibiogrammes (mesures de diamètres)

Antibiogramme en mm	Souche		
	S/92 1495	S/92 1495 Δ <i>emrB</i> :: <i>kan</i>	S/92 1495 Δ <i>emrR</i> :: <i>kan</i>
Ampicilline	26	25	24
Chloramphénicol	20-30	22-30	20-30
Florfénicol	19-27	20-27	18-28
Streptomycine	18	19	19
Spectinomycine	19-27	23-26	23-25
Sulfamide	24-30	23-28	24-30
Tétracycline	20-26	21-26	20-26
Triméthoprime	27	27	25
Gentamicine	21-24	21-26	21-25
Kanamycine	21-25	9	6
Néomycine	19-21	15	12
Cefalexine	26	25	22
Ceftiofur	26	25	25
Ceftriaxone	30	30	28
Ceftazidime	25	25	24
Azithromycine	>30	>30	29
Ciprofloxacin	>30	>30	>30
Enrofloxacin	>30	>30	>30
Marbofloxacin	>30	>30	>30
Fluméquine	>30	>30	29
Acide nalidixique	25	25	21

Tableau IV. Résultats CMI des sels biliaires et détergent

CMI (mg/l)	Souche		
	S/92 1495	S/92 1495 Δ <i>emrB::kan</i>	S/92 1495 Δ <i>emrR::kan</i>
CHOL	> 51200	> 51200	> 51200
DOC	51200	51200	51200
SDS	51200	25600	51200

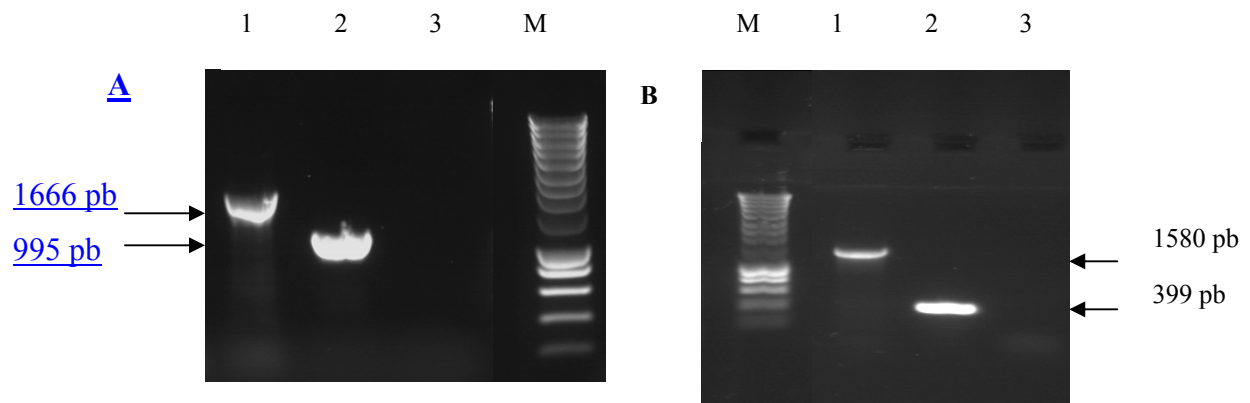


Figure 1. PCR de contrôle de délétion du gène *emrB* (A) et *emrR* (B). M : marqueur de taille, 1 : mutant, 2 : souche parentale, 3 : témoin négatif.

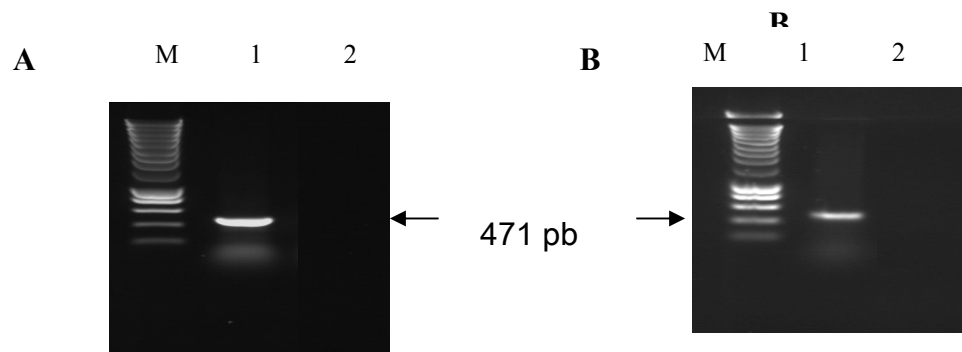


Figure 2. PCR de contrôle de la présence du gène de la résistance à la kanamycine. A : S/92 1495 Δ *emrB*::kan, B : S/92 1495 Δ *emrR*::kan. M : marqueur de taille, 1 : mutant, 2 : souche parentale.

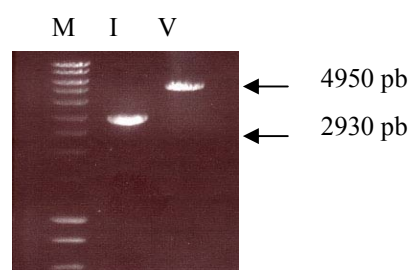


Figure 3 : PCR de contrôle de l'insert et du vecteur avant la ligation. M : marqueur de taille, I : insert, V : vecteur