

## ***Vibrio cholerae* à Madagascar : étude d'une souche multirésistante**

Rakoto Alson AO, Dromigny JA, Pfister P, Mauclère P (1)

**RESUME** : Le choléra a épargné Madagascar jusqu'en mars 1999 où le premier cas fut rapporté à Mahajanga, un port de la côte Nord-Est. Dix mois plus tard et malgré l'utilisation massive de tétracycline à titre prophylactique, toutes les régions de l'île ont été atteintes. Tout prélèvement suspect de choléra était envoyé systématiquement à l'Institut Pasteur de Madagascar pour identification et étude de la sensibilité des souches identifiées. C'est ainsi que suite à la découverte d'une souche de *Vibrio cholerae* multirésistante, nous avons décidé d'approfondir son étude par la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et par des études plasmidiques et de conjugaison.

Comme la souche initiale, cette souche montre une résistance au cotrimoxazole, à la streptomycine, au chloramphénicol et à l'agent vibriostatique O129 mais apparaît en plus fortement résistante à l'ampicilline et à la tétracycline. Elle héberge un plasmide de 26 kb transférable à *E. coli*. Les tests de transfert suggèrent un transfert interrompu à partir d'un seul plasmide (existence de ségrégants plasmidiques) ou l'acquisition de 2 plasmides différents. Le faible taux de transfert observé pourrait expliquer le caractère unique de cette souche.

L'apparition de cette souche multirésistante doit encourager les autorités sanitaires malgaches à maintenir un réseau de surveillance épidémiologique du choléra à travers tout le pays et à poursuivre les prélèvements bactériologiques de suivi de l'état de sensibilité du vibrion aux antibiotiques.

**Mots-clés** : *Vibrio cholerae* - Résistance aux antibiotiques - Plasmide - Madagascar.

**ABSTRACT** : "Multiresistant *Vibrio cholerae* strain in Madagascar : report of the first case": Madagascar was cholera free until March 1999. The first case was reported in Mahajanga, a north west coast harbor. Ten months later and despite a massive use of tetracycline as prophylactic drug, cholera had reached every region of the island.

All suspected cholera samples were analysed at the Pasteur Institute of Madagascar where susceptibility to tetracycline was systematically performed. On February 2000, a multidrug resistant strain of *V. cholerae* was isolated. We studied this strain by performing Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and by plasmidic and conjugative assay.

As the original strain, this multiresistant *V. cholerae* showed a resistance to cotrimoxazole, to streptomycin and chloramphenicol but, in addition to, appeared strongly resistant to ampicillin and tetracycline. This strain harboured a 26 kb self-transmissible plasmid. Conjugation tests showed the possibility of plasmidic segregates or acquisition of two different plasmids. The weak transfer rate could explain why we have isolated only one multiresistant strain.

The emergence of a such multiresistant strain should encourage the medical authorities to reinforce the epidemic survey in every medical Malagasy district and to carry out new antimicrobial surveys to describe the mechanisms of the spread of these resistances.

**Key-words** : *Vibrio cholerae* - Drug resistance - Plasmid - Madagascar.

### **INTRODUCTION**

Le choléra est connu depuis l'antiquité où il sévissait à l'état endémique dans le delta du Gange (Inde). Sept pandémies de choléra ont été recensées depuis le début du XIX<sup>ème</sup> siècle [1]. Le choléra a atteint l'Afrique vers 1970 et a épargné Madagascar jusqu'en mars 1999 [2].

La première souche malgache, isolée chez un garçon de 10 ans à l'Hôpital Androva de

Mahajanga, a été identifiée comme *Vibrio cholerae*, séro groupe O1, sérotype Ogawa, biotype El Tor [2]. Le profil de restriction rRNA de cette souche présentait des similarités avec des souches isolées en Afrique et aux Comores depuis respectivement 1994 et 1998 [3,4]. L'antibiotype montrait une résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole (cotrimoxazole), sulfonamides, triméthoprime, chloramphénicol, streptomycine et à l'agent vibriostatique O129 avec une sensibilité conservée pour la tétracycline, l'ampicilline, la céfalotine et la péfloxacine [4].

<sup>1</sup> Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar.

Les autorités sanitaires malgaches, s'appuyant sur la sensibilité de la souche d'origine aux cyclines, ont décidé d'utiliser la doxycycline pour une vaste campagne de chimioprophylaxie (avec instauration de barrages sanitaires) et la prise en charge des malades atteints du choléra. Ainsi de grandes quantités de ce médicament ont été distribuées dans tout le pays pouvant faire craindre l'apparition rapide de chimiorésistance comme cela a déjà été rapporté dans de nombreux pays [5,6].

Depuis le début de l'épidémie, le Centre de Biologie Clinique (CBC) de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) a la charge, à partir des prélèvements de selles venant de toute l'île, d'identifier *V. cholerae* et d'étudier sa sensibilité aux antibiotiques. C'est ce rôle de sentinelle qui a permis de détecter un nouveau profil de résistance. Devant l'originalité de cet antibiotype, nous avons tenté de déterminer plus précisément les niveaux de résistance de cette souche par des études de Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et d'approcher le mécanisme moléculaire de ces résistances par des études plasmidiques et de conjugaison.

## MATERIEL ET METHODES

Entre mars 1999 et avril 2000, 704 prélèvements de selles ou de vomissures ont été analysés au CBC. A partir de juillet 1999, toutes les souches identifiées ont été testées systématiquement vis-à-vis de la tétracycline.

Ce protocole de recherche d'antibiotypes nouveaux a permis d'identifier, en février 2000, une souche multirésistante isolée chez une fille de 14 ans admise à l'Hôpital général de Befelatanana d'Antananarivo.

Dès le début de l'épidémie tout prélèvement de selles suspect de choléra était acheminé au laboratoire de bactériologie du CBC de l'IPM. Le mode de transport principal était du papier Whatmann bien que quelques échantillons, en provenance d'Antananarivo, nous soient parvenus sous formes de tubes stériles ou d'écouvillons plongés en milieu de transport de Cary Blair.

Les échantillons sont traités dès leur arrivée au laboratoire. Nous procédons à un enrichissement systématique des selles en eau peptonée alcaline à 37°C pendant 2 à 8 heures. Puis, nous ensemençons des géloses sélectives TCBS et GNA (BioRad®) que nous laissons incuber 18 heures à 37°C. Nous identifions les colonies suspectes à l'aide de galeries API 20E (bioMérieux®) et par agglutination avec le sérum anti *Vibrio cholerae* O : 1 (BioRad®). En cas de doute, les souches sont envoyées au Centre

National de Référence des Vibrions à Institut Pasteur de Paris (*Dr JM Fournier*) pour identification.

Pour réaliser les antibiogrammes, nous utilisons la méthode de diffusion en gélose de Müller Hinton avec disque d'antibiotiques (BioRad®) [7]. En cas d'apparition d'un antibiotype différent de celui de la souche d'origine, un antibiogramme complémentaire composé de 25 antibiotiques est réalisé (ampicilline, ticarcilline, amoxicilline + acide clavulanique, amoxicilline, céfalotine, céfotaxime, ceftazidime, imipénème, streptomycine, spectinomycine, tobramycine, amikacine, kanamycine, gentamycine, nétilmycine, chloramphénicol, tétracycline, minocycline, doxycycline, cotrimoxazole, sulfamide, acide nalidixique, péfloxacin, rifampicine et agent vibriostatique O 129). Les diamètres d'inhibition ont été relevés pour chacun des antibiotiques testés et interprétés selon les critères du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [8].

Nous avons étudié la CMI de la souche résistante et de la souche d'origine vis-à-vis de 7 antibiotiques (tétracycline, ampicilline, amoxicilline, sulfaméthoxazole, triméthoprime, cotrimoxazole et chloramphénicol), choisis en fonction des résistances mis en évidence.

Nous avons préparé une gamme de concentrations pour chaque antibiotique allant de 5 120 à 5 µg/ml. Puis, nous avons réalisé une suspension de la souche à tester afin d'obtenir une concentration finale de 10<sup>7</sup> à 10<sup>9</sup> cfu/ml. Finalement, après mélange de 1,8 ml de la suspension bactérienne à 0,2 ml de chaque dilution d'antibiotique et incubation de 18 heures à 37°C, nous avons effectué la lecture en retenant comme valeur de la CMI, la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a plus de croissance bactérienne visible [9].

La mise en évidence de plasmides conjuguatifs portant des caractères de résistance aux antibiotiques se fait par croisement de la souche à étudier avec une souche réceptrice. Le transfert en bloc d'un ou de plusieurs caractères de résistance de la souche donatrice à la souche réceptrice fait suspecter l'existence d'un ou de plusieurs plasmides comme support génétique des caractères transférés. Il s'agit de sélectionner les bactéries réceptrices ayant acquis les caractères de résistance aux antibiotiques transférables tout en éliminant les bactéries donatrices. La sélection s'effectue avec au moins 2 antibiotiques : l'un correspondant à un caractère suspecté plasmidique de la donatrice, l'autre à un caractère non

transférable (chromosomique) de la réceptrice.

La souche réceptrice était un *Escherichia coli* K12 résistante uniquement à la rifampicine (caractère d'origine chromosomique et considérée comme non transférable).

Dix colonies fraîches de la souche donatrice et réceptrice ont été reprises dans 10 ml de bouillon cœur cerveau pendant 2 heures à 37°C avant conjugaison.

Nous avons effectué 2 essais de conjugaison en préparant 2 mélanges avec des proportions différentes entre les souches donatrices et réceptrices afin de favoriser la possibilité de transfert plasmidique (Tableau I)

Tableau I : Mélanges des souches donatrice et réceptrice pour essai de conjugaison

	Souche donatrice	Souche réceptrice
Mélange 1	2 ml	2 ml
Mélange 2	3 ml	5 ml

Après incubation pendant 40 minutes à 37°C, les mélanges ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> et au 1/100<sup>ème</sup> et 100 µl de chaque dilution ont étéensemencés en râteau sur des géloses de Müller Hinton renfermant les antibiotiques (40 µg/ml de cotrimoxazole + 50 µg/ml de rifampicine) permettant d'isoler les transconjugants.

Après incubation de 24 heures à 37°C, nous avons dénombré les colonies de transconjugants et les colonies de la souche donatrice afin de calculer le taux de transfert.

$$\text{Taux de transfert} = \frac{\text{nombre de colonies de transconjugants}}{\text{nombre de colonies donatrices}}$$

Quant à l'étude plasmidique, il s'agit dans un premier temps de sélectionner le maximum de bactéries hébergeant le plasmide à extraire en procédant à une culture de 24 heures à 37°C en milieu liquide (bouillon de Luria-Bertani) additionné d'ampicilline à la concentration de 100 µg/ml pour maintenir une pression de sélection.

L'extraction plasmidique a été ensuite réalisée avec le kit QIAGEN Plasmid (QIAGEN®). Il s'agit d'une lyse alcaline ménagée de la bactérie suivie d'une extraction de l'ADN plasmidique suivant un degré croissant de salinité.

Dans un second temps, les profils de restriction ont été déterminées (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism).

Un microlitre de la suspension d'ADN préalablement extrait a été incubé pendant une heure au bain-marie à 37°C avec 1 µl des 2 enzymes de restriction testées (Hind III - USB Corporation® et Eco RI - Boehringer Mannheim Biochemica®) et 2 µl du tampon correspondant. Le volume de

travail a été ramené à 20 µl avec de l'eau pour biologie moléculaire.

La migration en champ électrophorétique a été réalisée sur gel d'agarose à 1%, pendant 36 mn, sous 80 V. Le marqueur de poids moléculaire a été le ladder 1 Kb (New England Biolabs®). Les bandes de restriction ont été révélées par coloration au bromure d'éthidium et la lecture a été effectuée par transillumination UV. Les gels ont été photographiés par un appareil Polaroid et les profils interprétés en méthode visuelle.

## RESULTATS

### 1- Etude de la sensibilité de la souche résistante

• Antibiogramme complémentaire : suite à la découverte d'une résistance à la tétracycline sur une souche isolée en février 2000, nous avons réalisé un antibiogramme complémentaire afin de mieux caractériser les différentes résistances apparues (Tableau II).

Après enquête, nous avons appris que la patiente était décédée du fait d'une réhydratation tardivement mise en œuvre et d'un traitement antibiotique inadaptée à base de doxycycline.

Tableau II : Sensibilité de la souche résistante à la tétracycline (souche R) et de la souche d'origine (souche O) vis-à-vis d'un antibiogramme élargi

Antibiotiques	Souches ∅	R	Souches ∅	O
Ampicilline	6	R	24	S
Ticarcilline	10	R	24	S
Amoxicilline + Ac. clavulanique	20	S	20	S
Amoxicilline	6	R	21	S
Céfalotine	20	S	26	S
Céfotaxime	28	S	34	S
Céflazidime	26	S	26	S
Imipénème	24	S	25	S
Streptomycine	6	R	6	R
Spectinomycine	20	S	18	S
Tobramycine	16	S	20	S
Amikacine	18	S	18	S
Kanamycine	19	S	19	S
Gentamycine	20	S	20	S
Nétilmycine	25	S	25	S
Chloramphénicol	20	I	20	I
Tétracycline	6	R	30	S
Minocycline	16	R	27	S
Doxycycline	6	R	28	S
Cotrimoxazole	6	R	6	R
Sulfamide	6	R	6	R
Ac. nalidixique	16	I	15	I
Péfloxacin	25	S	27	S
Rifampicine	25	S	25	S
O 129	6	R	6	R

∅ : Diamètre d'inhibition en mm.

Interprétation : S : Sensible ; I : Intermédiaire ; R : Résistant

Par rapport à la souche d'origine isolée à Mahajanga, nous observons l'apparition :

- d'un phénotype de résistance vis-à-vis des bêta-lactamines type pénicillinase de bas niveau

(résistance à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à la ticarcilline avec sensibilité conservée à l'association amoxicilline/acide clavulanique et à la céfalotine).

- d'une résistance croisée entre toutes les cyclines.

• Détermination des CMI : nous avons déterminé les CMI de la souche résistante et de la souche d'origine vis-à-vis de 7 antibiotiques (Tableau III).

Tableau III : CMI de la souche résistante et d'origine vis-à-vis de 7 antibiotiques

Antibiotiques	Souche R	Souche O
Tétracycline	64	1
Ampicilline	512	1
Amoxicilline	512	1
Sulfaméthoxazole	4 096	8 192
Triméthoprim	2 048	2 048
Cotrimoxazole	16 384	16 384
Chloramphénicol	8	8

Par rapport à la souche d'origine, nous constatons de fortes CMI vis-à-vis des pénicillines du groupe A, alors que la CMI à la tétracycline est modérément élevée. En revanche, les souches malgaches sont d'un très haut niveau de résistance vis-à-vis du cotrimoxazole (et de ses constituants) contre indiquant formellement son utilisation. Le niveau de résistance du chloramphénicol apparaît identique dans les 2 souches.

## 2- Transfert de résistance à une souche *Escherichia coli* K12

Lors du premier essai de conjugaison, il apparaît que la souche réceptrice a acquis les caractères de résistance au cotrimoxazole, aux sulfamides, au chloramphénicol, à la streptomycine et au composé vibriostatique O129 (Tableau IV) avec une fréquence de  $2,10^{-9}$ .

Tableau IV : Premier essai de conjugaison

Antibiotiques	Diamètre d'inhibition en mm et interprétation (R, I, S)		
	<i>V. cholerae</i> donateur	<i>E. coli</i> récepteur avant conjugaison	<i>E. coli</i> récepteur après conjugaison
Cotrimoxazole	6 (R)	25 (S)	6 (R)
Sulfamides	6 (R)	25 (S)	6 (R)
Chloramphénicol	20 (I)	20 (I)	6 (R)
Ampicilline	6 (R)	20 (S)	21 (S)
Tétracycline	6 (R)	18 (S)	18 (S)
Streptomycine	6 (R)	20 (S)	6 (R)
Fosfomycine	12 (R)	35 (S)	35 (S)
Vibriostatique O 129	6 (R)	12 (I)	6 (R)

Nous observons un très faible taux de transfert des résistances. De plus, ce transfert apparaît partiel puisque les transconjugants sont toujours sensibles à l'ampicilline et à la tétracycline. Le transconjugant obtenu présente un antibiotype identique à celui de la souche d'origine. En revanche, la résistance au chloramphénicol semble mieux s'exprimer dans les transconjugants que dans la souche multirésistante de *V. cholerae*.

Lors du deuxième essai de conjugaison, la souche de *V. cholerae* multirésistante a transmis en bloc toutes ses résistances à la souche de *E. coli* réceptrice (Tableau V). La fréquence de transfert a été de  $10^{-7}$ .

Nous notons que la résistance au chloramphénicol est toujours mieux exprimée sur la souche d'*E. coli* transconjugante que sur *V. cholerae* mais de façon moins nette que lors du premier essai.

Le taux de transfert apparaît toujours très faible.

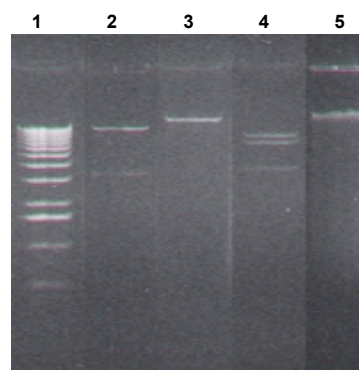
Tableau V : Deuxième essai de conjugaison

Antibiotiques	Diamètre d'inhibition en mm et interprétation (R, I, S)		
	<i>V. cholerae</i> donateur	<i>E. coli</i> récepteur avant conjugaison	<i>E. coli</i> récepteur après conjugaison
Cotrimoxazole	6 (R)	25 (S)	6 (R)
Sulfamides	6 (R)	25 (S)	6 (R)
Chloramphénicol	20 (I)	20 (I)	15 (R)
Ampicilline	6 (R)	20 (S)	6 (R)
Tétracycline	6 (R)	18 (S)	8 (R)
Streptomycine	6 (R)	20 (S)	6 (R)
Fosfomycine	12 (R)	35 (S)	15 (R)
Vibriostatique O 129	6 (R)	12 (I)	6 (R)

Nous avons pu extraire de la souche multirésistante un plasmide de 25,7 kilobases (environ à 16,7 Mda).

La digestion de ce plasmide avec Hind III a permis d'obtenir 2 fragments. Avec Eco RI, nous avons pu linéariser le plasmide. L'action combinée de ces 2 enzymes a donné 3 fragments correspondant respectivement à 10,8 kb, 9,3 kb et 5,6 kb.

Photo : Plasmide extrait de la souche multirésistante après digestion enzymatique



1- marqueur de poids moléculaire  
3- digestion avec Eco RI  
5- plasmide natif

2- digestion avec Hind III  
4- digestion avec Hind III + Eco RI

## DISCUSSION

Le choléra après avoir atteint l'Afrique en 1970 s'est propagé à travers tout le continent en acquérant de multiples résistances [4,5,6]. C'est ainsi que la souche qui a touché Madagascar en mars 1999 était déjà résistante à de nombreux antibiotiques [3].

Notre étude originale, sur une souche multirésistante apparue sur la Grande Ile, nous permet de faire le point sur les mécanismes de résistance affectant la souche d'origine et de définir les nouvelles résistances apparues.

- La première souche de *V. cholerae* isolée à Madagascar, tout comme les souches comoriennes, est résistante au triméthoprim-sulfaméthoxazole, aux sulfonamides, au triméthoprim à la streptomycine, au chloramphénicol et au composé vibriostatique O129.

- Les souches malgaches apparaissent fortement résistantes au triméthoprim avec une CMI de plus de 4096 µg/ml. La résistance au triméthoprim a été rapportée pour la première fois pendant l'épidémie de 1980 au Bangladesh [10]. Depuis d'autres souches résistantes ont été isolées en Afrique [11,12]. Les premiers plasmides identifiés ayant conféré une résistance au triméthoprim sont ceux dérivés de 2 souches isolées en Tanzanie en 1985 lesquelles étaient également résistantes au sulfaméthoxazole, à l'ampicilline, à la streptomycine, au chloramphénicol et à la tétracycline [12]. Des souches africaines incluses dans une étude de *Ouellette et al* pourraient être de résistance équivalente avec une CMI > 1280 µg/ml [13] alors que les souches zairoises semblent être bien moins résistantes [14].

*Ouellette* a constaté que la résistance de haut niveau au triméthoprim et au composé vibriostatique O129 était croisée. Cette résistance est due à la présence d'une dihydrofolate réductase (DHFR) de type I ou II codée par des gènes localisés originellement sur des plasmides de résistance [13]. *Gerbaud et al* ont par ailleurs montré que les transposons et les plasmides peuvent être tous les deux responsables de la dissémination de la résistance croisée triméthoprim/composé vibriostatique O129 [11].

- Les souches malgaches présentent un haut niveau de résistance aux sulfamides avec une CMI supérieure à 8 000 µg/ml. Cette CMI est nettement supérieure à celle des souches algériennes (128 µg/ml) [15]. De la même manière, la CMI du cotrimoxazole s'élève à plus de 16000 µg/ml. De telles CMI ont, en revanche, déjà été rapportées lors des épidémies tanzanienne, rwandaise et sénégalaise entre 1994 et 1996 [16,17]. Par conséquent, le cotrimoxazole, bien que largement distribué à Madagascar, n'a pas pu être utilisé pour le traitement du choléra.

Le principal mécanisme de résistance aux sulfamides se situe au niveau d'une enzyme inactivatrice : la dihydroptéroate synthétase (DHPS) [18]. La résistance est croisée entre tous les

sulfamides et est médiée par des gènes plasmidiques ou chromosomiques [19].

- La résistance à la streptomycine est de haut niveau chez les souches malgaches avec une CMI de 128 µg/ml.

L'inactivation enzymatique est le mécanisme le plus fréquent de résistance acquise aux aminosides suite à la synthèse d'une enzyme qui modifie l'antibiotique [20]. Parmi les 3 classes d'enzymes, l'adénylyl ou nucléotidyltransférase AAD ou ANT, la phosphotransférase APH et l'acétyltransférase AAC, seules les 2 premières modifient la streptomycine et/ou la spectinomycine [21]. Ces enzymes modificatrices des aminosides sont le plus souvent codées par un gène plasmidique [22,23] ou transposable [24,25].

On retrouve le même niveau de résistance chez les souches algériennes en 1994 qui serait due à la production d'une phosphotransférase codée par un gène plasmidique active seulement sur la streptomycine mais pas sur la spectinomycine [15].

Aucune autre résistance aux aminosides n'a été observée parmi les souches isolées à Madagascar bien que la résistance à la kanamycine soit souvent rapportée pour les souches de *V. cholerae* multirésistantes [6,10,26,27].

- Les souches malgaches ont une faible sensibilité au chloramphénicol avec un diamètre d'inhibition de 20 mm et une CMI à 8 µg/ml. De même, les souches indiennes et bangladaises sont modérément résistantes [28] alors que 26% des souches angolaises isolées entre 1987 et 1990 sont nettement plus résistantes avec une CMI à 32 µg/ml [29].

La résistance au chloramphénicol est fréquemment liée à la présence d'un plasmide. Le mécanisme plasmidique est surtout enzymatique par l'intermédiaire d'une chloramphénicol acétyltransférase (CAT) qui inactive l'antibiotique en l'empêchant de se fixer sur sa cible [30,31]. En outre, nous notons que la résistance au chloramphénicol, semble mieux s'exprimer sur les *E. coli* transconjugants. Ce fait a déjà été retrouvé par *Towner et al* [6] et par *Ferreira et al* [29]. Le gène déterminant la résistance au chloramphénicol serait, selon *Hedges et Jacob*, insuffisamment exprimé dans *V. cholerae* [32].

- La souche multirésistante apparue à Madagascar a acquis, seulement 10 mois après l'introduction de *V. cholerae* dans l'île, des résistances vis-à-vis des cyclines et des pénicillines du groupe A.

- La tétracycline a été partout largement utilisée dans le monde du fait de sa faible toxicité et de son large spectre d'action mais aussi de son

accessibilité. Cependant, son utilisation a été progressivement limitée par l'apparition d'un nombre croissant de résistances [33].

La rapidité de l'apparition de la résistance aux cyclines à Madagascar peut s'expliquer par la mise en place par les autorités sanitaires malgaches de vastes campagnes de chimioprophylaxie (avec instauration de barrages sanitaires) à base de doxycycline. Comme cela a déjà été rapporté notamment en Tanzanie, la large distribution de cyclines favorise le développement rapide de résistance, probablement médiée par des plasmides [26]. De plus, nous notons que la souche malgache présente une résistance de plus haut niveau par rapport aux souches tanzaniennes et zaïroises (CMI 32 µg/ml) [6,14], algériennes (CMI = 8-24 µg/ml) [15] et angolaises (CMI = 16 µg/ml) [29].

Le principal mécanisme de résistance aux cyclines repose sur l'insuffisance de concentration liée à un efflux massif de l'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique [31]. La résistance à la tétracycline est fréquemment associée à d'autres antibiotiques en raison de son déterminisme plasmidique [34,35,36]. Elle est le plus souvent médiée par des plasmides portant des déterminants appelés *tet* [37]. Deux grand types de déterminants ont été décrits :

- le type *tet* A qui entraîne un niveau de résistance élevé à l'égard de l'oxytétracycline et de la tétracycline mais faible vis-à-vis de la minocycline et doxycycline;

- le type *tet* B qui s'exprime par un niveau élevé de résistance à l'égard des cyclines.

La résistance croisée vis-à-vis de toutes les cyclines fait supposer que notre souche d'étude porte le déterminant *tet* B.

- La forte résistance observée à l'ampicilline et à l'amoxicilline (avec une CMI égale à 512 µg/ml) est probablement due à une pénicillinase de bas niveau (résistance à la ticarcilline et sensibilité à l'association amoxicilline - acide clavulanique et à la céfalotine). Des souches isolées en Tanzanie et en République Démocratique du Congo (ex-Zaïre) apparaissent moins résistantes avec une CMI ne dépassant pas 128 µg/ml [6,14]. Toutefois, nous retrouvons un niveau de résistance semblable au notre chez 86% des souches angolaises [29].

La résistance des souches de *V. cholerae* documentées jusqu'à maintenant à l'ampicilline est médiée par un plasmide codant en même temps pour de nombreux autres antibiotiques [34,35,36].

Les pénicillinases portées par des plasmides ont souvent été retrouvées dans la plupart des bacilles à Gram négatif dont les plus connues sont TEM1 et SHV1 [37].

- Dans un premier temps, tous les caractères de résistance hormis ceux de la tétracycline et de l'ampicilline ont été transférés à la souche d'*E. coli*. Nous avons obtenu par conséquent un transconjuguant présentant les mêmes résistances que le *V. cholerae* d'origine. Lors de la deuxième conjugaison, toutes les résistances ont été transférées à *E. coli*.

Ce phénomène suggère un transfert interrompu à partir d'un seul plasmide (existence de ségrégants plasmidiques) [10] ou l'acquisition d'un deuxième plasmide conférant une nouvelle résistance à la tétracycline et à l'ampicilline.

La reconnaissance des plasmides du groupe d'incompatibilité C dans de nombreuses souches de *V. cholerae* El Tor laisse supposer que ces plasmides possèdent une affinité spéciale pour *V. cholerae* [38]. Une étude de *Rahal et Gerbaud* a montré que seuls 4 plasmides du groupe Inc C et un du groupe Inc J parmi les 22 étudiés ont été stables chez *V. cholerae* [39]. Ainsi, des plasmides appartenant au groupe Inc C ont été retrouvés sur les souches tanzaniennes [6] et kenyanes [34]. Plus précisément, *Kruse et al* ont rapporté la résistance de souches cholériques africaines codée par un plasmide appartenant au groupe Inc6-C et qui portait les gènes de résistance au triméthoprime, au sulfaméthoxazole, au chloramphénicol, à la tétracycline, à l'ampicilline et à la streptomycine [36]. Nous pouvons supposer que la souche résistante malgache héberge également un plasmide du groupe Inc 6-C.

La faible fréquence de transfert observée ( $10^{-8}$  à  $10^{-11}$ ) par rapport aux autres cas documentés ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) [10,13] pourrait également expliquer le caractère unique de cette souche.

La taille des plasmides de résistance se situe généralement entre 1 et 400 kb [40]. Le plasmide extrait de notre souche multirésistante est de taille plus réduite (25,7 kb-16 MDa) par rapport à ce qui a été décrit dans la littérature : 60 MDa pour les souches italiennes et albanaises [41], 91 MDa pour les souches brésiliennes [42] ou 100 MDa pour les souches kenyanes [43].

L'acquisition de ce plasmide a pu être favorisée par la promiscuité avec d'autres entérobactéries telles que les salmonelles ou les shigelles, porteuses de plasmides particulièrement résistants tant sur le continent africain qu'à Madagascar (14,44,45). On ne peut pas non plus écarter la possibilité d'un ou de plusieurs intégrons portés par ce plasmide et dont la prévalence semble particulièrement forte chez des souches multirésistantes aux antibiotiques [46,47].

## CONCLUSION

Cette première étude nous a permis d'approcher les mécanismes de résistances de cette nouvelle souche malgache.

L'apparition d'une souche de *V. cholerae* multirésistante à Madagascar apparaît comme un signal d'alerte important pour les autorités sanitaires du pays. Bien que le principal traitement du choléra consiste au remplacement des pertes hydro-électrolytiques, l'antibiothérapie restera souvent utilisée pour les cas graves.

La surveillance épidémiologique du choléra dans tout le pays doit être maintenue, et il est très important, pour chaque nouveau foyer identifié, de poursuivre les prélèvements bactériologiques destinés à suivre l'état de résistance du vibron aux antibiotiques.

## REMERCIEMENTS

Au Dr Dominique Rousset, pour son soutien technique, aux laboratoires OFAFA qui nous ont fourni gracieusement les poudres d'antibiotiques et aux responsables des laboratoires de bactériologie CHU Bordeaux II qui nous ont fourni la souche *Escherichia coli* K12 et apporté leur avis sur l'interprétation des résultats.

## REFERENCES

- 1- Bourgeade A, Rey M. Le choléra. Encycl Méd Chir (Paris-France), Maladies infectieuses, F 8-026, 1979.
- 2- Ratsimbazafimahefa RH, Ranjalahy R, Rakotondramarina D, Lamina A, Randrianarisoa P, Ranaivo Rahamefy J. Etude de cas sur le début de l'épidémie de choléra à Madagascar dans la province de Mahajanga. *Gazetintsika* (MINSAN) 1999; **44** : 1-4.
- 3- Germani Y, Quilici ML, Glaziou P, Mattera D, Morvan J, Fournier JM. Emergence of cholera in the Central African Republic. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; **17** : 888-990.
- 4- Duval P, Champetier de Ribes G, Ranjalahy J, Quilici ML, Fournier JM. Cholera in Madagascar. *Lancet* 1999; **353** : 2068.
- 5- Garrigue GP et coll. Résistance aux antibiotiques des souches de *Vibrio cholerae* El Tor isolées à Douala (Cameroun). *Bull Soc Pathol Exot* 1986; **79** : 305-312.
- 6- Towner KJ, Pearson NJ, Mhalu FS, O'grady F. Resistance to antimicrobial agents of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during the fourth cholera epidemic in the United Republic of Tanzania. *Bull WHO* 1980; **58** : 747-751.
- 7- National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests : Approved standard, 4<sup>th</sup> ed. Villanova : National committee for clinical laboratory standards, 1990; Vol 10: 569-571.
- 8- Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 1998. *Path Biol* 1998; **46** : I-XVI.
- 9- Eberlin T, Renaud F. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques In : Frenay J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Manuel de bactériologie clinique, 2<sup>éd</sup>. Paris : Elsevier, 1994; Vol 1 : 431-456. (Collection Option Bio).
- 10- Threlfall EJ, Rowe B, Huq I. Plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor from Bangladesh. *Lancet* 1980; **1** : 1247-1248.
- 11- Gerbaud G, Dodin A, Goldstein F, Courvalin P. Genetic basis of trimethoprim and O/129 resistance in *Vibrio cholerae*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1985; **136 B** : 265-273.
- 12- Young HK, Amyes SG. Plasmid trimethoprim resistance in *Vibrio cholerae* : migration of the type I dihydrofolate reductase gene out of the Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 1986; **17** : 697-703.
- 13- Ouellette M, Gerbaud G, Courvalin P. Genetic, biochemical and molecular characterization of strains of *Vibrio cholerae* multiresistant to antibiotics. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1998; **139** : 105-113.
- 14- Cavallo JD, Niel L, Talarmin A, Dubrous P. Sensibilité aux antibiotiques de souches épidémiques de *Vibrio cholerae* et *Shigella dysenteriae* 1 isolées dans des camps de réfugiés rwandais au Zaïre. *Med Trop* 1995; **55** : 351-353.
- 15- Korichi MN, Belhocine S, Rahal K. Plasmides Inc J identifiés pour la première fois dans *Vibrio cholerae* El Tor. *Med Trop* 1997; **57** : 249-252.
- 16- Materu SF, Lema OE, Mukunza HM, Adhiambo CG, Carter JY. Antibiotic resistance pattern of *Vibrio cholerae* and *Shigella* causing diarrhoea outbreaks in eastern Africa region : 1994-1996. *East Afr Med J* 1997; **74** : 193-197.
- 17- Sow AI, Faye Niang MA, Dieng M, Toure K, Fall D, Soumare M, Seydi M, Ndour CT, Cisse MF, Samb A. Sensitivity to cotrimoxazole of bacteria isolated at the Central University Hospital of Fann, Dakar. *Dakar Med* 1999; **44** : 20-24.
- 18- Glass RI, Huq I, Alim AR, Yumus M. Emergence of multiply antibiotic-resistant *Vibrio cholerae* in Bangladesh. *J Infect Dis* 1980; **142** : 939-942.
- 19- Gerbaud G, Goldstein F. Triméthoprim et sulfamides. In : Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J. L'antibiogramme. Paris : MPS-Vidéom, 1985 : 65-71.
- 20- Tankovic J. Antibiotiques antibactériens. *Rev Prat* 2000; **50** : 425-432.
- 21- Lemozy J, Bismuth R, Courvalin P. Entérobactéries et aminosides. In : Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J. L'antibiogramme. Paris : MPS-Vidéom, 1985 : 111-125.
- 22- Sandvang D. Novel streptomycin and spectinomycin resistance gene as a gene cassette within a class 1 integron isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43** : 3036-3038.
- 23- Davies JE, Smith DI. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann Rev Microbiol* 1978; **32** : 469-518.
- 24- Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, Maurer JJ. Incidence and characterisation of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43** : 2925-2929.
- 25- Cornelis G. Transposons et séquences d'insertion. *Bull Inst Pasteur* 1982; **80** : 3-59.
- 26- Mhalu FS, Mmari PW, Ijumba J. Rapid emergence of El Tor *Vibrio cholerae* resistant to antimicrobial agents during first six months of fourth cholera epidemic in Tanzania. *Lancet* 1979; **1** : 345-347.
- 27- Coppo A, Colombo M, Pazzani C, Bruni R, Mohamud KA, Omar KH, Mastrandrea S, Salvia AM, Rotigliano G, Maimone F. *Vibrio cholerae* in the horn of Africa : epidemiology, plasmids, tetracycline resistance gene amplification, and comparison between O1 and non-O1

- strains. *Am J Trop Med Hyg* 1995; **53** : 351-359.
- 28- **Yamamoto T, Nair GB, Albert MJ, Parodi CC, Takeda Y.** Survey of *in vitro* susceptibilities of *Vibrio cholerae* O1 and O139 to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39** : 241-244.
- 29- **Ferreira E, Costa M, Vaz Pato MV.** Résistance aux antibiotiques des souches de *Vibrio cholerae* isolées en Angola. *Path Biol* 1992; **40** : 561-565.
- 30- **Peyret M.** Mécanismes de résistance aux antibiotiques. In : Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Manuel de bactériologie clinique, 2 ed. Paris : Elsevier, 1994; Vol 1 : 413-430. (Collection Option Bio).
- 31- **Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J.** Antibiotic resistance in the ECOR collection : integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44** : 1568-1574.
- 32- **Hedges RW, Jacob AE.** A 98 megadalton R factor of compatibility group C in a *Vibrio cholerae* El Tor isolated from Southern USSR. *J Gen Microbiol* 1975; **89** : 383-386.
- 33- **Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA.** Bacterial resistance to tetracycline : mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* 1992; **5** : 387-399.
- 34- **Finch MJ, Morris JG Jr, Kaviti J, Kagwanja W, Levine MM.** Epidemiology of antimicrobial resistant cholera in Kenya and East Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1988; **39** : 484-490.
- 35- **Olukoya DK, Ogunjimi AA, Abaelu AM.** Plasmid profiles and antimicrobial susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O1 strains during a recent outbreak in Nigeria. *J Diarrhoeal Dis Res* 1995; **13** : 118-121.
- 36- **Kruse H, Sorum H, Tenover FC, Olsvik Ø.** A transferable multiple drug resistance plasmid from *Vibrio cholerae* O1. *Microb Drug Resist* 1995; **1** : 203-210.
- 37- **Courvalin P, Philippon A.** Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. In : Le Minor L, Veron M. Bactériologie Médicale. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1989 : 333-354.
- 38- **Rahal K, Gerbaud GR, Chabbert YA.** Caractérisation d'un facteur de résistance transférable de *Vibrio cholerae* biotype El Tor. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1973 ; **124 B** : 283-294.
- 39- **Rahal K, Gerbaud G, Bouanchaud DH.** Stability of R plasmids belonging to different incompatibility groups in *Vibrio cholerae* "Eltor". *Ann Microbiol* 1978; **129** : 409-414.
- 40- **Courvalin P, Trieu-Cuot P.** Plasmides et transposons de résistance aux antibiotiques. In : Le Minor L, Véron M. Bactériologie médicale, 2 ed. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1990 : 316-331.
- 41- **Falbo V, Carattoli A, Tosini F, Pezzela C, Dionisi AM, Luzzi I.** Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class1 integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43** : 693-696.
- 42- **Hofer E, Quintaes BR, dos Reis ER, Rodrigues D dos P, Seki LM, Feitosa IS, Ribeiro LH, Ferreira MR.** The emergence of multiple antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* isolated from gastroenteritis patients in Ceara, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; **32** : 151-156.
- 43- **Ichinose Y, Ehara M, Watanabe S, Shimodori S, Waiyaki PG, Kibue AM, Sang FC, Ngugi J, Kaviti JN.** The characterization of *Vibrio cholerae* isolated in Kenya in 1983. *J Trop Med Hyg* 1986; **89** : 269-276.
- 44- **Cassel-Béraud AM.** Enquête étiologique et épidémiologique à propos d'une épidémie de dysentérie dans la région d'Ambohimahaso (Madagascar). *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1987; **55** : 195-197.
- 45- **Cassel-Béraud AM.** Enquêtes étiologiques et épidémiologiques à propos d'épidémies de dysentérie dans différentes régions de Madagascar. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1988; **56** : 183-185.
- 46- **Recchia GD, Hall RM.** Origine of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* 1997; **5** : 389-394.
- 47- **Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D.** Super-integrons. *Res Microbiol* 1999; **150** : 641-651.