

Détermination de l'antibiorésistance des salmonelles isolées

6.1. Matériel et méthode

6.1.1. Matériel

Un total de 139 souches de salmonelles isolées au cours de cette étude a été testé avec 16 antibiotiques différents pour la mesure de résistances. Les antibiotiques utilisés sont : AMP (ampicilline), AMC (amoxicilline + acide clavulanique), CHL (chloramphenicol), SXT (triméthoprimine + sulfaméthoxazole), CEF (céfalocone), CTX (cefotaxime), CAZ (ceftazidime), SSS (sulfamides), STR (streptomycine), TET (tétracycline), CS (colistine), K (kanamycine), GM (gentamycine), NA (acide nalidixique), OFX (ofloxacine), ENR (enrofloxacine).

6.1.2. Méthode

La mesure de résistance des souches bactériennes aux antibiotiques ou antibiogramme, a été effectuée à l'unité CEB (Caractérisation et Epidémiologie Bactérienne) du Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur l'Hygiène et la Qualité des Aliments (LERHQA) de l'Anses, Maisons-Alfort. Elle a été réalisée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton à partir de 16 disques d'antibiotiques (BIORAD), selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2009).

Les antibiotiques testés sont: AMP: (10 µg), AMC: (20/10 µg), CHL: (30 µg), SXT: (1,25/23,75 µg), CEF: (30 µg), CTX: (30 µg), CAZ: (30 µg), SSS: (200 µg), STR: (10 UI), TET: (30 UI), CS: (50 µg), K: (30 UI), GM: (10 UI), NA: (30 µg), OFX: (5 µg), ENR: (5 µg).

A partir d'une culture de souche bactérienne pure de 18 à 24 h solide à 37 °C sur milieu solide, des suspensions à 0.5 MC Farland sont préparées en sérum physiologique et écouvillonnées sur des géloses Mueller-Hinton. Seize disques d'antibiotiques sont apposés sur chaque gélose Mueller-Hinton. La lecture s'est effectuée 18 à 20 h après incubation à 37°C.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition ont été réalisées par un automate de lecture, OSIRIS system (BIORAD), puis les résultats sont interprétés selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2011). *Escherichia coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche contrôle qualité.

6.2. Résultats

6.2.1. Antibiorésistance des isolats de salmonelles

Parmi les 139 souches de *Salmonella* isolées de 16 fermes avicoles et de 5 hôpitaux, la majorité était sensible à tous les 16 différents antibiotiques testés (Standards CLSI), excepté quelques sérotypes qui étaient diversement résistants. Il s'agissait de certaines souches issues des fermes avicoles dont *Salmonella* Colindale qui présentaient une sensibilité diminuée aux quinolones et fluoroquinolones (NA, OFX, ENR), *Salmonella* Limete résistante à 3 antibiotiques (SXT, SSS, TET), *Salmonella* Minnesota résistant à 5 classes différentes d'antimicrobiens (AMP, CHL, SXT, SSS, STR, TET) et de 2 isolats de *S. Enteritidis* d'origine humaine, résistant aussi aux fluoroquinolones (NA, OFX, CIP) (Tableau 32).

Tableau 32 : Profils d'antibiorésistance des souches de salmonelles isolées des fermes avicoles et hôpitaux de N'Djamena.

Sérovars	Nombre d'isolats		Origines	Résistance aux antimicrobiens
	Testés	Résistants		
<i>Salmonella</i> Colindale	16	12	Aviaire	NAL ¹ , OFX ¹ , ENR ¹
<i>Salmonella</i> Limete	1	1	Aviaire	SXT, SSS, TET
<i>Salmonella</i> Minnesota	15	15	Aviaire	AMP, CHL, SXT, SSS, STR, TET
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2	2	Humaine	NA, OFX, CIP

1= sensibilité diminuée. NB : tous les autres isolats de salmonelles sont multi-sensibles

NAL: acide nalidixique, OFX: ofloxacin, ENR: enrofloxacin, CIP: ciprofloxacine, SXT: triméthoprime-sulfaméthoxazole, SSS: Sulfonamide, TET: tétracycline, AMP: ampicilline, CHL: chloramphénicol, STR: streptomycine.

6.2.2. Séquençage du gène codant la MR observée chez *Salmonella* Minnesota

Le séquençage a été réalisé par la société Eurofins MWG Operon (Eurofins MWG GmbH, Anzinger Str. 7a/ D-85560 Ebersberg, Germany). Quatre paires d'amorces différentes ont été utilisées pour le séquençage complet du gène codant la multi-résistance observée chez *S. Minnesota*. Il s'agissait des amorces : GGCATCCAAGCAGCAAGC (segment conservé, 5'-CS-Int1), AAGCAGACTTGACCTGAT (3'-CS-Int1) et GACATCATTCCTGGCGTTA (T-531-Fw), TGGCACAGCGGATCGCAAAC (T-531-Rv). Les deux premières amorces sont celles qui s'hybrident dans les segments conservés des intégrons dans le sens 5' – 3' et les deux suivantes sont les amorces qui ont été nécessaires pour terminer le séquençage dans les deux sens.

L'analyse des différentes séquences a permis de révéler deux gènes cassettes codant la résistance aux aminoglycosides (streptomycine) et au triméthoprime (**figure n°10**) localisés au niveau d'une des parties variables de l'intégron de classe 1.

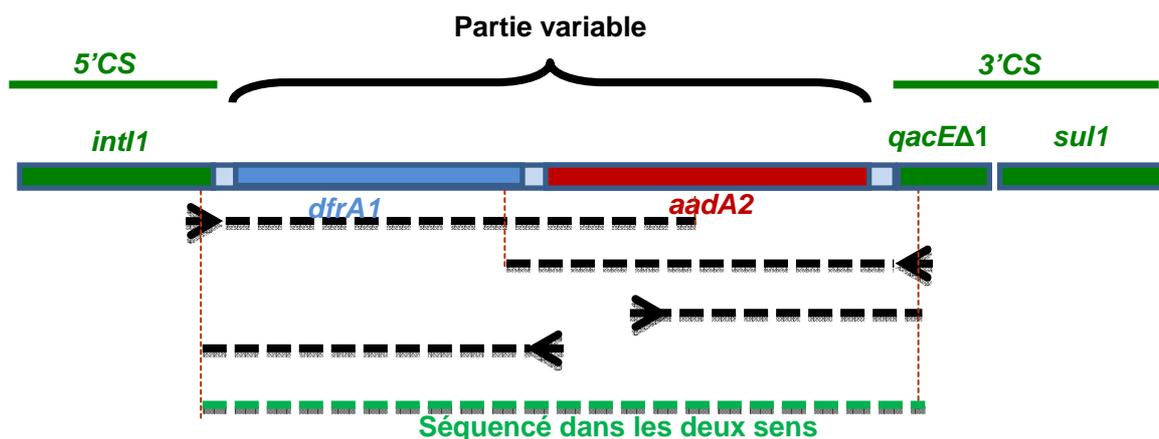


Figure 10 : Diagramme schématique de la partie variable de l'intégron de classe 1 montrant les deux gènes cassettes (*dfrA1* et *aadA2*) et les 2 segments conservés (5'-CS et 3'-CS)

6.3. Discussion

Notre étude a montré que la majorité des souches de *Salmonella* isolées était sensible à toute la gamme d'antibiotiques testée. Dans le passé, *S. Colindale* ne semblait porter de résistance acquise (Dione *et al.*, 2011). Mais au cours de cette dernière décennie, un isolat a été décrit en 2008, portant le gène *qnrB1* codant la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, associé à une résistance à l'ampicilline et au céfotaxime (Murray *et al.*, 2008). Cette proportion non négligeable d'isolats de *Salmonella* Colindale d'origine aviaire, présentant une résistance aux fluoroquinolones, en particulier à l'acide nalidixique, ne faisait que compléter l'augmentation croissante des résistances bactériennes à cette molécule, observée au cours de ces dernières années (Aarestrup *et al.* 2003 ; Giraud *et al.*, 2006).

Les isolats de *Salmonella* Minnesota étaient quant à eux, multi-résistants à l'ampicilline, au chloramphénicol, au triméthoprim, aux sulfamides, à la streptomycine et à la tétracycline. A notre connaissance, aucune étude antérieure n'avait encore rapporté cette multi-résistance de *S. Minnesota*. Ce phénotype de multi-résistance observé pourrait être attribué à des gènes localisés dans une structure génomique particulière appelée *Salmonella* Génomique Island 1 (SGI1). Cette structure est souvent associée à des résistances multiples aux antimicrobiens rencontrés chez certains lysotypes de *S. Typhimurium* et chez quelques bactéries à Gram négatif (Mulvey *et al.*, 2006). Le séquençage d'une partie de cet intégron a permis de révéler deux gènes cassettes localisés au niveau de la partie variable de l'intégron de classe 1. La première cassette est identifiée par le gène *dfrA1* (dihydrofolate réductase de type A1) codant la résistance au triméthoprim et la deuxième cassette par le gène *aadA2* (aminoglycoside-*o*-adenyltransférase de type A2) codant la résistance aux aminoglycosides. Ces deux gènes *dfrA1* et *aadA2* codant respectivement pour la résistance au triméthoprim et à la streptomycine, sont assez fréquents chez de nombreuses salmonelles d'origines humaine, animale et environnementale (An Vo *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2004 ; Michael *et al.*, 2006 ; Randall *et al.*, 2004). C'est aussi le cas de *Salmonella* Limete qui était résistant aux sulfamides, au triméthoprim et à la tétracycline. Les 2 isolats de *Salmonella* Enteritidis d'origine humaine étaient quant à eux, résistants à l'acide nalidixique, à l'ofloxacine et à la ciprofloxacine. La résistance à bas niveau de *Salmonella* Enteritidis aux fluoroquinolones n'est pas nouvelle. Plusieurs études menées dans de nombreux pays, ont montré que *Salmonella* Enteritidis, isolée chez les animaux comme chez les humains, présentait des résistances de plus en plus accrues aux antimicrobiens de la famille des fluoroquinolones (Aarestrup *et al.*, 2003 ; Cheung *et al.*, 2005 ; Hopkins *et al.*, 2005). En effet, il est certain que dans de nombreux cas, la salmonellose est une infection à guérison spontanée. Cependant, dans des situations assez graves le recours aux antibiotiques est recommandé pour la guérison des malades. Le traitement habituel repose sur les bêta-lactamines (ampicilline) ou les fluoroquinolones (ciprofloxacine) ou encore sur l'association sulfamides + triméthoprim communément appelée cotrimoxazole.

Au cours de notre présente étude, nous n'avons pas détecté beaucoup de résistances parmi nos isolats. Cependant, la question de résistance chez les salmonelles demeure toujours un enjeu de santé publique, car elle affecte assez souvent les traitements de base contre la salmonellose invasive. Il n'existe pas de système de sécurité sociale au Tchad. L'assurance maladie n'existe pas et les dépenses de santé sont à la charge des malades. Les prélèvements bactériologiques et antibiogrammes ne sont pas pratiqués. Les fluoroquinolones et les céphalosporines de troisième génération sont devenues aujourd'hui des antibiotiques de premier choix pour le traitement des salmonelloses. Il est donc indispensable que leur prescription et leur utilisation soient réglementées pour prévenir une sélection des souches résistantes à ces antibiotiques comme c'est le cas dans de nombreux pays (Hopkins *et al.*, 2005 ; Wiuff *et al.*, 2000).

7. Caractérisation moléculaire des salmonelles isolées

7.1. Généralités

Plusieurs méthodes génotypiques sont utilisées avec succès pour évaluer et déterminer la contribution des bactéries pathogènes, d'origines diverses, aux infections humaines. Les méthodes moléculaires de typage de souches bactériennes constituent actuellement un moyen épidémiologique important pour la détermination de potentielles sources d'infections. En effet, la distribution des souches typiques de *Salmonella* circulant parmi les différentes espèces animales offre une information précieuse pour la compréhension épidémiologique de la résistance bactérienne et de la dissémination des clones particuliers dans l'environnement. Dans cette étude, nous avons utilisé les méthodes appelées IS-PCR (Insertion Sequence-Polymerase Chain Reaction), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction) et PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) ou pulsotypage, dans le but d'une part d'indiquer l'existence d'une diversité de clones au sein du genre *Salmonella* et d'autre part, de proposer une analyse plus fine de ces clones pouvant appartenir à des groupes phylogénétiquement proches ou éloignés et d'identifier les possibles sources et réservoirs d'infections dues à salmonelles dans la ville de N'Djamena.

7.2. Matériel et méthodes

7.2.1. Matériel

Nous avons mené l'analyse sur l'ensemble des 41 différents sérotypes isolés au cours des deux campagnes de collectes dans les 16 fermes avicoles et les 5 hôpitaux de N'Djamena.

7.2.2. Méthodes

7.2.2.1. La PCR

7.2.2.1.1. Extraction de l'ADN par la méthode d'ébullition

Après une culture de nuit de la souche bactérienne dans 5 mL de BHI à 37°C, nous avons prélevé 1,5 mL de cet inoculum dans un tube Eppendorff de 2 mL que nous avons centrifugé à 12000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et le précipité re-suspendu dans 100 µL d'eau ultra pure stérile, le tout re-centrifugé à 12000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant a été encore éliminé une seconde fois, puis le précipité dissout dans 100 µL d'eau ultra pure stérile. Cette dernière suspension a été portée à ébullition pendant 10 min, puis centrifugée à 12000 tr/min pendant 10 min (pour séparer l'ADN des autres constituants de la bactérie). Nous avons prélevé délicatement 60 µL du surnageant dans un autre tube Eppendorf, que nous avons aliquoté en 2 fois 30 µL, dans des tubes PCR de 0,5 µL, et conservé à -20° C jusqu'à utilisation.

7.2.2.1.2. Principe de la PCR

La PCR (Polymerisation Chain Reaction) repose sur une amplification d'extraits d'ADN par la Taq polymérase, en présence d'amorces spécifiques et de nucléotides (dNTP). L'amplification permet d'obtenir en un nombre très élevé de copies d'une séquence particulière d'ADN. La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant :

- De faibles quantités d'extraits d'ADN possédant la séquence à amplifier ;

- Les deux amorces nucléotidiques complémentaires qui encadrent la cible à amplifier ;
- La Taq polymérase et un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP).

Elle débute par une étape de dénaturation thermique de l'ADN à amplifier, suivie d'une hybridation des séquences oligonucléotidiques complémentaires ou amorces aux extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN matrice. L'allongement des amorces dans le sens 5' → 3' est ensuite assuré par la Taq polymérase. Les molécules filles d'ADN ainsi formées sont dénaturées de nouveau, et un autre cycle peut recommencer. La réaction se répète ainsi plusieurs fois et cela en fonction du programme PCR préalablement défini et enregistré ou non dans le thermocycleur.

7.2.2.1.3. ERIC-PCR et IS - PCR

7.2.2.1.3.1. ERIC – PCR

C'est une PCR dont les profils permettent d'indiquer l'existence d'une diversité au sein du genre ou clone bactérien. Dans cette PCR, les régions d'ADN génomique à amplifier correspondent à des séquences hautement répétées et conservées dans le génome bactérien. Elle permet d'une part de rendre compte de la dispersion des séquences d'ADN caractéristiques de chaque souche bactérienne et, d'autre part de proposer une analyse plus fine du génome bactérien appartenant à des groupes phylogénétiquement proches ou éloignés.

Les séquences d'unités ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), également connues comme des unités intergéniques répétées sont présentes en plusieurs copies au sein du génome de *Salmonella*, de *E. coli* et d'autres entérobactéries. Ces éléments, longs de 126 pb sont très bien conservés au niveau nucléotidique. La position de ces éléments dans le génome des entérobactéries varient selon les espèces et peut être utilisée comme marqueur génétique pour caractériser les isolats des espèces bactériennes (Hulton *et al.*, 1991). Les séquences des deux amorces oligonucléotidiques utilisées sont:

ERIC 1R: 5' ATG-TAA-GCT-CCT-GGG-GAT-TCA-C 3'

ERIC 2 : 5' AAG-TAA-GTG-ACT-GGG-GTG-AGC-G 3'

Le mélange réactionnel ou mix de l'Eric pcr, comprenant les volumes nécessaires à la réaction a été réalisé avec une paire d'amorces : ERIC 1R et ERIC 2. Chaque volume de 25 µL pour une réaction pcr, était composé de 2,5 µL de Tampon 10X (MgCl₂), de 0,5 µL de dNTP (10 mM), de 0,2 µL de Taq DNA polymerase (5 U µL⁻¹), de 0,25 µL d'amorce ERIC 1R (50 µM), de 0,25 µL d'amorce ERIC 2 (50 µM), de 2,5 µL d'extraits d'ADN et de 18,8 µL d'eau ultra pure stérile pour ajuster le volume final.

L'amplification a été ensuite réalisée dans un thermocycleur (Courtaboeuf, France), de type Perkin Elmer 9700 d'après le programme suivant : une pré-dénaturation à 94° C pendant 3 min, une hybridation à 48° C pendant 1 min et une élongation à 72° C pendant 4 min, suivi de 35 cycles de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'hybridation à 51° C pendant 1 min et d'élongation à 72° C pendant 4 min puis une dernière phase de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'hybridation à 51° C pendant 1 min et une élongation finale à 72° C pendant 10 min.

Après l'amplification, la migration des produits PCR a été réalisée sur le gel d'agarose à 2% (Sigma-Aldrich) dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X à 120 V pendant 2 h 30 min. Le gel a été ensuite coloré au BET (bromure d'éthidium) pendant 45 min et visualisé sous UV (260 nm) à l'aide d'un appareil polaroid pour la capture d'image.

7.2.2.1.3.2. IS – PCR

Les différents isolats ont été également caractérisés par l'IS (Insertion Sequence) PCR. Il s'agit pour ce type de PCR, d'amplifier les segments qui se trouvent entre les gènes, en utilisant pour chacun, un couple d'amorce défini ciblant des séquences connues et répétées du génome des bactéries. On obtient ainsi des profils spécifiques de chaque souche, selon l'emplacement et le nombre de copies de ces séquences au sein du génome bactérien (Millemann *et al.*, 2000).

Les séquences des deux amorces oligonucléotidiques utilisées sont:

IS 1R: 5' AGGCGCATCTGAAAAACCTCGG 3'

IS 2: 5' CGGAACCCCCAGCCTAGCTGGG 3'

Le mix de l'IS-pcr a été réalisé avec une paire d'amorces : IS 1R et IS 2. Chaque volume de 25 μL pour une réaction IS-pcr, était composé de 2,5 μL d'extraits d'ADN, de 2,5 μL de Tampon 10X (MgCl_2), de 0,5 μL de dNTP (10 mM), de 4 μL d'amorce IS 1R (5 μM), de 4 μL d'amorce IS 2 (5 μM), de 0,2 μL de Taq DNA polymérase (5 U μL^{-1}) et de 11,3 μL d'eau ultra pure stérile pour ajuster le volume final.

L'amplification a été ensuite réalisée dans un thermocycleur (Courtaboeuf, France) de type Perkin Elmer 9700 d'après le programme suivant : une pré-dénaturation à 94° C pendant 3 min, une hybridation à 52° C pendant 1 min et une élongation à 72° C pendant 4 min, suivi de 45 cycles de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'hybridation à 53° C pendant 1 min et d'élongation à 72° C pendant 4 min puis une dernière phase de dénaturation à 94° C pendant 1 min, d'hybridation à 53° C pendant 1 min et une élongation finale à 72° C pendant 20 min.

Après l'amplification, la migration des produits IS-pcr a été réalisée sur le gel d'agarose à 2% (Sigma-Aldrich) dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X à 120 V pendant 3 h. le gel a été ensuite coloré au BET pendant 60 min et visualisé sous UV (260 nm) à l'aide d'un appareil polaroid pour la capture d'image.

7.2.2.2. Electrophorèse en champ pulsé (pulsotypage)

7.2.2.2.1. Principe du pulsotypage

La technique utilisée est basée sur l'analyse de l'ADN total qui est un marqueur très stable. Initialement, l'utilisation d'enzymes de restriction à haute fréquence de coupure rendait l'interprétation complexe, du fait de la présence d'un nombre élevé de fragments sur le gel. Le recours à des enzymes de restriction à faible fréquence de coupure a permis de diminuer le nombre de fragments. Cependant, ces fragments étaient de plus haut poids moléculaire et dans un gel classique, de telles molécules avaient une mobilité restreinte et n'avaient donc pas la possibilité d'être séparées.

En 1984, apparaît un nouveau concept de séparation des molécules d'ADN supérieure à 50 Kb. Celui-ci a été proposé par Schwartz et Cantor (1984). Il s'agissait d'utiliser des champs électriques activés alternativement (champs pulsés). Cette technologie permet de séparer des molécules d'ADN variant de quelques Kb à environ 10 Mb. Le protocole utilisé pour cette étude est celui décrit par Peters *et al.* (2003). Ce dernier a été adapté à partir d'un protocole défini pour *Escherichia coli* par le CDC (Center for Diseases Control) d'Atlanta, Etats Unis d'Amérique. Un protocole standardisé a également été publié par Ribot *et al.* (2006). Il comporte trois grandes étapes :

7.2.2.2.2. Extraction de l'ADN

Au préalable à l'extraction de l'ADN, il est nécessaire de mettre en culture les bactéries. Un premier ensemencement est réalisé sur gélose Drigalski (Bio Merieux, Marcy l'Etoile, France), afin de vérifier la pureté des souches. Une colonie de cette gélose est ensuite repiquée sur une gélose de TSAYE (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England). A partir de ces boîtes, une suspension bactérienne est réalisée dans un tampon CSB (Cell Suspension Buffer). Cette suspension est alors incubée quelques minutes avec de la protéinase K, afin d'améliorer l'étape de lyse en dégradant les protéines. L'un des critères importants du protocole est l'obtention d'un ADN purifié. Il ne doit subir aucune dégradation c'est à dire aucune coupure physique ou enzymatique.

Pour ce faire, l'ADN est emprisonné dans des petits blocs d'agarose (plugs) afin de le protéger pour les étapes suivantes. Les plugs sont alors incubés dans une solution de lyse contenant de la protéinase K. L'adjonction d'un détergent (le SDS) au moment de l'inclusion du matériel génétique dans l'agarose permet de délipider la membrane bactérienne et de renforcer l'étape de la lyse. Les plugs sont enfin rincés plusieurs fois à l'eau puis au TE (Tris-Ethylène Diamine Tétracétique Acide) puis stockés à 4° C ou utilisés directement pour la digestion enzymatique.

7.2.2.2.3. Digestion enzymatique

Le choix des enzymes de restriction est important, et il se porte sur celles ayant des sites de restriction rares sur le chromosome bactérien. Elles permettent de couper le chromosome en 10 à 20 fragments de grandes tailles, qui seront alors séparés par l'électrophorèse en champ pulsé. Différents facteurs entrent en jeu pour le choix des enzymes. Le pourcentage en guanine et cytosine (GC %) du génome bactérien à analyser est important à prendre en compte. Un ADN avec un faible pourcentage sera coupé en un petit nombre de fragments, si on utilise des enzymes reconnaissant des sites riches en guanine et cytosine. L'utilisation d'enzymes de ce type permettra, sur des séquences riches en adénine et thymine, d'obtenir un nombre de fragments limité.

Pour la même raison, l'utilisation d'enzymes ayant des sites de restriction riches en adénine et thymine, telles que *SpeI* ou *XbaI* seront préconisées chez les bactéries à Gram négatif dont le chromosome est riche en guanine et cytosine. *XbaI* est d'ailleurs l'enzyme majoritairement utilisée pour le pulsotypage des salmonelles, notamment dans notre travail. Les plugs sont mis à incuber dans une solution contenant l'enzyme choisie au bain-marie, à la température optimale d'action de l'enzyme (37° C pour *XbaI*). La digestion dure au minimum 4 heures mais elle peut être réalisée sur une nuit.

7.2.2.4. Séparation électrophorétique

Une fois la digestion terminée, les plugs sont insérés dans un gel d'agarose. Ce dernier est ensuite déposé dans une cuve à électrophorèse en champ pulsé (CHEF-DR III, Bio-Rad, Marnes La-Coquette, France) dont le générateur est programmé pour la séparation des fragments d'ADN (Figure 11). L'électrophorèse dure environ 20 heures. Différents facteurs interviennent dans la séparation des fragments d'ADN lors de l'électrophorèse. La concentration en agarose est notamment un paramètre essentiel. Les fragments d'ADN migrent d'autant plus loin que les concentrations d'agarose sont plus faibles. La concentration est choisie en fonction de la taille des fragments à séparer. Pour des fragments de grandes tailles (jusqu'à 3 Mb), il est préférable d'utiliser une faible concentration d'agarose. Les gels sont classiquement à 1 %, pour permettre une bonne vitesse de migration ainsi qu'une bonne résolution tout en limitant l'éventuelle fragilité du gel.

La température du tampon d'électrophorèse a également des effets importants sur la mobilité de l'ADN, en particulier lorsque la migration s'effectue à fort voltage pendant 20-24 heures. Une augmentation de la température augmente la mobilité de l'ADN, mais diminue la résolution des profils. Le maintien d'une température entre 12 et 16°C est nécessaire pendant toute la durée de l'électrophorèse, pour obtenir un bon compromis entre durée et résolution. Il faut donc adjoindre un dispositif de refroidissement. La température utilisée est, le plus couramment, de 14° C. Enfin, les cinétiques de pulsation doivent être optimisées pour chaque espèce et pour chaque enzyme, afin d'obtenir une séparation adéquate. La durée des phases de pulsation (correspondant aux inversions alternatives d'orientation du champ électrique) augmente, au cours de l'électrophorèse. Les phases de pulsations de faibles durées en début d'électrophorèse vont favoriser la séparation des fragments de petites tailles, alors que les phases de longues durées en fin de migration, vont permettre une bonne séparation des fragments de grandes tailles (Grattard, 2000).

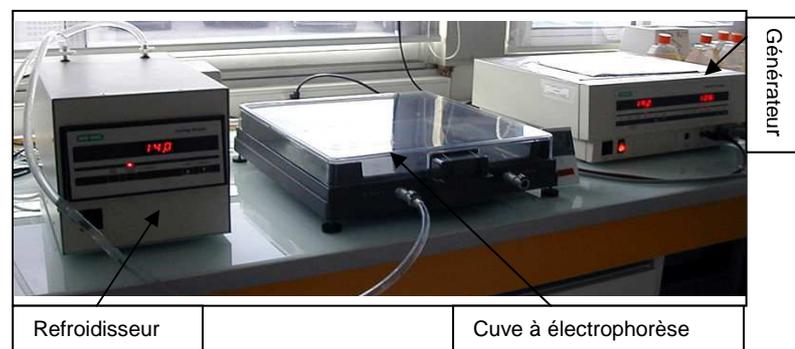


Figure 11 : Photo du système d'électrophorèse en champ pulsé, CHEF DR III

A la fin de la migration, le gel est enlevé de la cuve et mis à colorer dans une solution de BET (bromure d'éthidium), agent intercalant fluorescent sous lumière ultraviolette, pendant 30 minutes puis rincé 30 minutes à l'eau ultra pure avant la lecture. Le gel est photographié