

Recherche de mutants de Francisella tularensis résistants aux fluoroquinolones chez les patients atteints de tularémie

Gautier Hoarau

▶ **To cite this version:**

Gautier Hoarau. Recherche de mutants de Francisella tularensis résistants aux fluoroquinolones chez les patients atteints de tularémie. Médecine humaine et pathologie. 2012. dumas-00840391

HAL Id: dumas-00840391

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00840391

Submitted on 2 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier GRENOBLE MEDECINE

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

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

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2012 **N°**

Recherche de mutants de *Francisella tularensis* résistants aux fluoroquinolones chez les patients atteints de tularémie

Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale
Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de thèse

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLOME D'ETAT

Gautier HOARAU
Né le 18 septembre 1983 au Port (974)

Thèse soutenue publiquement à la faculté de médecine de Grenoble*
Le 28 septembre 2012

Devant le Jury composé de :

Président : **Monsieur le Professeur Jean- Paul STAHL**
Membres: **Monsieur le Professeur Max MAURIN (directeur de thèse)**
Monsieur le Professeur Patrice MORAND
Monsieur le Docteur Jacques CROIZE
Monsieur le Docteur Olivier EPAULARD

*La faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2012 **N°**

Recherche de mutants de *Francisella tularensis* résistants aux fluoroquinolones chez les patients atteints de tularémie

Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale
Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de thèse

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLOME D'ETAT

Gautier HOARAU
Né le 18 septembre 1983 au Port (974)

Thèse soutenue publiquement à la faculté de médecine de Grenoble*
Le 28 septembre 2012

Devant le Jury composé de :

Président : **Monsieur le Professeur Jean- Paul STAHL**
Membres: **Monsieur le Professeur Max MAURIN (directeur de thèse)**
Monsieur le Professeur Patrice MORAND
Monsieur le Docteur Jacques CROIZE
Monsieur le Docteur Olivier EPAULARD

*La faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
2011-2012

Nom	Prénom	Intitulé de la discipline universitaire
ALBALADEJO	Pierre	Anesthésiologie-réanimation
ARVIEUX-BARTHELEMY	Catherine	Chirurgie générale
BACONNIER	Pierre	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
BAGUET	Jean-Philippe	Cardiologie
BALOSSO	Jacques	Radiothérapie
BARRET	Luc	Médecine légale et droit de la santé
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et imagerie médicale
BEANI	Jean-Claude	Dermato-vénéréologie
BENHAMOU	Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
BERGER	François	Biologie cellulaire
BLIN	Dominique	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
BOLLA	Michel	Cancérologie; radiothérapie
BONAZ	Bruno	Gastroentérologie; hépatologie; addictologie
BOSSON	Jean-Luc	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie
BRICAULT	Ivan	Radiologie et imagerie médicale
BRICHON	Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
BRIX	Muriel	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
CAHN	Jean-Yves	Hématologie
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique; médecine d'urgence
CARPENTIER	Patrick	Chirurgie vasculaire; médecine vasculaire
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie
CHABARDES	Stephan	Neurochirurgie
CHABRE	Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
CHAFFANJON	Philippe	Anatomie
CHAVANON	Olivier	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
CHIQUET	Christophe	Ophtalmologie
CHIROSSEL	Jean-Paul	Anatomie
CINQUIN	Philippe	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
COHEN	Olivier	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
COUTURIER	Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
CRACOWSKI	Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale; pharmacologie clinique

DE GAUDEMARIS	Régis	Médecine et santé au travail
DEBILLON	Thierry	Pédiatrie
DEMATTEIS	Maurice	Addictologie
DEMONGEOT	Jacques	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie
ESTEVE	François	Biophysique et médecine nucléaire
FAGRET	Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
FAUCHERON	Jean-Luc	Chirurgie générale
FERRETTI	Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie
FONTAINE	Eric	Nutrition
FRANCOIS	Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GARBAN	Frédéric	Hématologie; transfusion
GAUDIN	Philippe	Rhumatologie
GAVAZZI	Gaetan	Gériatrie et biologie du vieillissement
GAY	Emmanuel	Neurochirurgie
GRIFFET	Jacques	Chirurgie infantile
HALIMI	Serge	Nutrition
HOMMEL	Marc	Neurologie
JOUK	Pierre-Simon	Génétique
JUVIN	Robert	Rhumatologie
KAHANE	Philippe	Physiologie
KRACK	Paul	Neurologie
KRAINIK	Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
LANTUEJOUL	Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
LEBAS	Jean-François	Biophysique et médecine nucléaire
LEBEAU	Jacques	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECCIA	Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
LEROUX	Dominique	Génétique
LEROY	Vincent	Gastroentérologie; hépatologie; addictologie
LETOUBLON	Christian	Chirurgie générale
LEVY	Patrick	Physiologie
LUNARDI	Joël	Biochimie et biologie moléculaire
MACHECOURT	Jacques	Cardiologie
MAGNE	Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MAITRE	Anne	Médecine et santé au travail
MAURIN	Max	Bactériologie-virologie
MERLOZ	Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique

MORAND	Patrice	Bactériologie-virologie
MORO-SIBILOT	Denis	Pneumologie
MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
MOUTET	François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique; brûlogie
PALOMBI	Olivier	Anatomie
PASSAGIA	Jean-Guy	Anatomie
PAYEN DE LA GARANDERIE	Jean-François	Anesthésiologie-réanimation
PELLOUX	Hervé	Parasitologie et mycologie
PEPIN	Jean-Louis	Physiologie
PERENNOU	Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PERNOD	Gilles	Médecine vasculaire
PIOLAT	Christian	Chirurgie infantile
PISON	Christophe	Pneumologie
PLANTAZ	Dominique	Pédiatrie
POLACK	Benoît	Hématologie
PONS	Jean-Claude	Gynécologie-obstétrique
RAMBEAUD	Jean-Jacques	Urologie
REYT	Emile	Oto-rhino-laryngologie
RIGHINI	Christian	Oto-rhino-laryngologie
ROMANET	Jean-Paul	Ophtalmologie
SARAGAGLIA	Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologique
SCHMERBER	Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
SELE	Bernard	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
SERGENT	Fabrice	Gynécologie-obstétrique
SESSA	Carmine	Chirurgie vasculaire
STAHL	Jean-Paul	Maladies infectueuses; maladies tropicales
STANKE	Françoise	Pharmacologie fondamentale
TIMSIT	Jean-François	Réanimation
TONETTI	Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologique
TOUSSAINT	Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
VANZETTO	Gérald	Cardiologie
VUILLEZ	Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
WEIL	Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
ZAOUI	Philippe	Néphrologie
ZARSKI	Jean-Pierre	Gastroentérologie; hépatologie; addictologie

Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier
2011-2012

Nom	Prénom	Intitulé de la discipline universitaire
BONNETERRE	Vincent	Médecine et santé au travail
BOTTARI	Serge	Biologie cellulaire
BOUTONNAT	Jean	Cytologie et histologie
BRENIER-PINCHART	Marie-Pierre	Parasitologie et mycologie
BRIOT	Raphaël	Thérapeutique; médecine d'urgence
CALLANAN-WILSON	Mary	Hématologie; transfusion
CROIZE	Jacques	Bactériologie-virologie
DERANSART	Colin	Physiologie
DETANTE	Olivier	Neurologie
DUMESTRE-PERARD	Chantal	Immunologie
EYSSERIC	Hélène	Médecine légale et droit de la santé
FAURE	Julien	Biochimie et biologie moléculaire
GILLOIS	Pierre	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
GRAND	Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
HENNEBICQ	Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
HOFFMANN	Pascale	Gynécologie-obstétrique
LABARERE	José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
LAPORTE	François	Biochimie et biologie moléculaire
LARDY	Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
LARRAT	Sylvie	Bactériologie-virologie
LAUNOIS-ROLLINAT	Sandrine	Physiologie
MALLARET	Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MAUBON	Danièle	Parasitologie et mycologie
MC LEER (FLORIN)	Anne	Cytologie et histologie
MOREAU-GAUDRY	Alexandre	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
MOUCHET	Patrick	Physiologie

PACLET	Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PASQUIER	Dominique	Anatomie et cytologie pathologiques
PAYSANT	François	Médecine légale et droit de la santé
PELLETIER	Laurent	Biologie cellulaire
RAY	Pierre	Génétique
RIALLE	Vincent	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
SATRE	Véronique	Génétique
STASIA	Marie-Josée	Biochimie et biologie moléculaire
TAMISIER	Renaud	Physiologie

REMERCIEMENTS

Au président du jury, Monsieur le Professeur Jean-Paul Stahl,
Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse, je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce travail.

Au directeur de thèse, Monsieur le Professeur Max Maurin,
Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Bactériologie, et de m'avoir accordé votre confiance pour effectuer ce travail. Merci de m'avoir guidé pendant ces semestres passés en bactériologie.

A Monsieur le Professeur Patrice Morand,
Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Virologie. Merci pour les tablettes de chocolat, et merci encore de vous priver d'un week-end à Rome pour juger mon travail.

A Monsieur le Docteur Jacques Croizé,
Je vous remercie pour votre disponibilité et votre accueil. J'ai particulièrement apprécié votre enthousiasme. Merci de m'avoir transmis cette passion de la microbiologie clinique. J'ai adoré ces discussions, que ce soit sur le pneumocoque, la double hémolyse de *Clostridium perfringens*, ou bien cette fameuse rencontre avec le Pr Henri Dabernat pour parler de paléobactériologie (notamment le prototype de *Mycobacterium tuberculosis*, et les lésions de *spina ventosa* chez des momies infantiles égyptiennes de l'ère prédynastique). Les bactéries sont vraiment fascinantes (et pas que les anaérobies : mais quand même une certaine prédilection pour ces bêtes malodorantes !!).

A Monsieur le Docteur Olivier Epaulard,
Merci Olivier de juger mon travail.

Je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire de bactériologie, en particulier **Jeanne Noëlle Del Bano**, et **Vivien Sutera** pour leur aide précieuse. Merci à **Dominique Champelovier** pour cette passion partagée des anaérobies. Merci aux Docteur **Christine Recule** et **Isabelle Pelloux** pour leurs conseils.

Merci au Docteur **Stéphane Bland**, et à tout le personnel du laboratoire d'Annecy. Merci à Stéphane d'avoir éveillé mon sens microbiologique.

Merci à mes co-internes biologistes et cliniciens. Merci à Cécile d'avoir relu mon manuscrit.

Merci à mes parents de m'avoir mené là où je suis aujourd'hui.

Merci à tous mes amis, et compagnons de cordée. A toutes ces belles réalisations en montagne. A la Meije, la plus belle des montagnes…

Résumé :

En Europe, les fluoroquinolones sont le traitement de première intention de la tularémie. Cependant, 10 à 15% des patients traités rechutent, suggérant la possibilité d'une sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones. Le but de cette étude était de développer un outil moléculaire permettant la détection de la résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis*, afin de détecter la présence de mutants résistants aux fluoroquinolones chez des patients en échec clinique.

Nous avons mis au point une PCR en temps réel, permettant la détection de mutations au niveau du QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *gyrA*, codant pour la sous unité A de l'ADN gyrase, principale cible des fluoroquinolones chez *F. tularensis*. La sensibilité et la spécificité de ce test ont été validées en utilisant des souches de *F. tularensis* sensibles aux fluoroquinolones, et des souches atténuées résistantes aux fluoroquinolones préalablement sélectionnées au laboratoire.

La PCR en temps réel a permis de différencier les souches sensibles des souches résistantes, d'après l'analyse des températures de fusion. Après analyse de 57 échantillons cliniques de ganglions suppurés, nous n'avons pas identifié de mutation de *gyrA*.

Notre test peut donc être utilisé en pratique clinique pour détecter les mutations de *gyrA* chez *F. tularensis* sur des souches ou directement sur des prélèvements cliniques. Cependant nos travaux indiquent que la sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones chez *F. tularensis*, après traitement, est vraisemblablement un phénomène très rare, et n'explique pas les rechutes fréquemment observées.

Mots clefs : *Francisella tularensis*, GyrA, tularémie, quinolone, résistance aux antibiotiques

Abstract:

In Europe, fluoroquinolones are considered as a first-line therapy of tularaemia. However, 10-15% of treated patients experience relapses, suggesting *in vivo* selection of fluoroquinolone-resistant mutants in *F. tularensis*. The aim of the present study was to develop a molecular tool allowing detection of fluoroquinolone resistance in *F. tularensis*, to tentatively detect fluoroquinolone-resistant mutants in clinical samples.

We designed a real time PCR assay for detection of mutations occurring in the Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) of the *gyrA* gene, encoding subunit A of DNA gyrase, the main target of fluoroquinolones in *F. tularensis*. The assay was validated using fluoroquinolone-susceptible *F. tularensis* strains, and fluoroquinolone-resistant strains with *gyrA* mutations previously selected in our laboratory.

The real-time PCR test allowed accurate differentiation of the wild-type strains from resistant mutants according to their respective melting temperatures. The specificity of our assay was confirmed using 32 clinical isolates of *Francisella tularensis,* characterized as wild type by sequencing of *gyrA* QRDR. We didn't find any *gyrA* mutant from clinical samples.

We have elaborated a new real-time PCR assay allowing accurate detection of *gyrA* mutations in *F. tularensis*. This test can now be used on a routine basis to detect fluoroquinolone resistance either in isolated *F. tularensis* strains or directly in clinical samples. Our preliminary experience, however, indicates that *in vivo* selection of mutants after fluoroquinolone therapy is probably a rare event, and may not explain the frequent relapses observed in tularemia patients.

Keywords: *Francisella tularensis*, tularaemia, quinolone, resistance, real time PCR, GyrA

Abréviations

CDC : Centers for diseases control
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament
PCR : Polymerase chain reaction
CNR : Centre national de référence
InVS : Institut national de veille sanitaire
CMI : Concentration minimale inhibitrice
BCYE : Buffered charcoal yeast extract
FDA : Food and drug administration
MDR : Multi drug resistant
CLSI: Clinical and laboratory standards institute
WHO: World health organization
ADN/DNA: acide désoxyribonucléique/deoxyribonucleic acid
QRDR: Quinolone resistance determining region

Table des matières

1. Introduction 14
2. Rappels bibliographiques sur la tularémie 16
2.1. Historique 16
2.2. Le genre Francisella : 16
2.2.1. Taxonomie 16
2.2.2. Bactériologie : 17
2.3. Epidémiologie 18
2.3.1. Répartition géographique 18
2.3.2. Incidence saisonnière et démographie 20
2.3.3. Réservoir, cycle animal 21
2.3.4. Transmission : 21
2.3.5. Facteurs de risque : 22
2.4. Diagnostic 22
2.4.1. Diagnostic clinique: 22
2.4.1.1. Forme ulcéro-ganglionnaire 23
2.4.1.2. Forme ganglionnaire 24
2.4.1.3. Forme oculo-ganglionnaire : 24
2.4.1.4. Forme oro-pharyngée 24
2.4.1.5. Forme pulmonaire 25
2.4.1.6. Forme typhoïdique 25
2.4.1.7. Autres manifestations cliniques : 26
2.4.1.8. Diagnostic différentiel 26
2.4.1.9. Complications 28
2.4.2. Diagnostic biologique 28
2.4.2.1. Examen direct : 28
2.4.2.2. Culture 28
2.4.2.3. Sérologie 30
2.4.2.4. PCR 30
2.4.2.5. Spectrométrie de masse MALDI-TOF 31
2.5. Sensibilité aux antibiotiques 32
2.5.1. Determination de la sensibilité in vitro 32
2.5.1.1. Antibiogramme en milieu solide 32
2.5.1.2. Antibiogramme en milieu liquide 33
2.5.2. Phénotype sensible 33
2.5.3. Activité clinique des antibiotiques 34
2.5.4. Résistances acquises 34
2.6. Recommandations thérapeutiques : 35
3. Rappels bibliographiques sur les fluoroquinolones 39
3.1. Structure 39
3.2. Spectre d'action et mécanisme d'action 40
3.3. Caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques 42
3.3.1. Pharmacodynamie 42
3.3.2. Pharmacocinétique 42
3.4. Mécanismes de résistance 42
3.4.1. Modification de la cible 43
3.4.2. Défaut d'accumulation cytoplasmique 44

3.4.2.1. Efflux 44
3.4.2.2. Défaut de pénétration 45
3.4.3. Résistance plasmidique 45
4. Travail personnel 46
5. Conclusions et perspectives 68
6. Annexe 1 69
7. Annexe 2 75
8. References 76

Tableaux et figures

Figure 1 : Coloration de Gram : petits coccobacilles à Gram négatif....18
Figure 2 : Répartition mondiale de *F. tularensis*....19
Figure 3 : Nombre de cas français notifiés à l'InVS entre 2003 et 2012....20
Figure 4 : Ulcère d'inoculation (4.1) et tularémie ganglionnaire (4.2) (WHO guidelines tularaemia)....24
Figure 5 : Antibiogrammes sur milieu de Mueller-Hinton enrichi par méthode E-test , et sur milieu chocolat Polyvitex par méthode des disques....32
Figure 6 : Structure des fluoroquinolones....39
Figure 7 : Mécanisme d'action des fluoroquinolones....41
Figure 8 : Représentation du QRDR de *gyrA de F. tularensis*....43

Tableau 1 : Diagnostics différentiels de la tularémie....27

1. Introduction

Francisella tularensis, agent étiologique de la tularémie, est une bactérie hautement pathogène. A ce titre, ce germe est reconnu par le CDC comme un agent de bioterrorisme de classe A. On constate une « émergence » de la maladie dans de nombreux pays où la tularémie n'avait jamais été décrite auparavant. A l'heure actuelle, l'ANSM (Agence Nationale de la Sécurité du Médicament, ex Afssaps) recommande l'utilisation d'une fluoroquinolone en traitement de première intention, pour une durée d'au moins 14 jours dans les formes de gravité faible à modérée, du fait de l'efficacité et l'innocuité de cet antibiotique.

Les rechutes cliniques sont fréquentes même après un traitement bien conduit, y compris avec les fluoroquinolones. Les complications à type de suppuration et de fistulisation des adénopathies sont fréquentes, et il n'est pas rare d'avoir recours à la chirurgie pour mise à plat des abcès. Nous pensons que certains échecs cliniques pourraient être dus à la sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones, en particulier lors d'un traitement inapproprié (faible dose ou durée trop courte).

L'antibiogramme de *F. tularensis* est rarement réalisé en pratique courante. En effet, la manipulation de cette bactérie est dangereuse (1), sa culture est fastidieuse, et les résistances acquises aux antibiotiques sont considérées actuellement comme rares voire inexistantes. En outre, les cultures sont le plus souvent négatives chez les patients sous traitement antibiotique, empêchant la mise en évidence de mutants résistants éventuels.

La facilité à créer des mutants de haut niveau de résistance aux fluoroquinolones *in vitro(2)* suggère que ce phénomène de sélection est possible *in vivo* chez *F. tularensis*. L'étude de ces souches mutées a permis d'identifier la protéine GyrA comme cible moléculaire principale des fluoroquinolones chez cette espèce. En effet, les mutations du gène *gyrA* codant pour GyrA semblent être impliquées en priorité dans la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones, comme cela a déjà été démontré chez d'autres bactéries à gram négatif.(3)

Le but de cette étude était de mettre au point une méthode de diagnostic rapide, par PCR en temps réel, recherchant les mutations de *gyrA* préalablement caractérisées comme étant impliquées dans la résistance aux fluoroquinolones *in vitro*. Secondairement, cette méthode a été appliquée aux prélèvements cliniques reçus au CNR Francisella de 2006 à 2011 pour valider le test sur des échantillons cliniques, et identifier de potentiels mutants résistants chez les patients en échec thérapeutique après traitement par une fluoroquinolone.

2. Rappels bibliographiques sur la tularémie

2.1. Historique

La tularémie a connu de nombreuses appellations suivant les pays, et les espèces animales touchées. La maladie aurait été décrite pour la première fois en 1837 par Soken(4), un médecin japonais. En 1911, Mac Coy dans le comté de Tulare (Californie, Etats unis) identifie chez des écureuils un agent de « pseudopeste » qu'il nomme *Bacterium tularense.* Le premier cas humain documenté est décrit en 1914 par Wherry et Lamb, lors d'un épisode de conjonctivite (forme oculoglandulaire). Francis clarifie la pathogénèse, les aspects cliniques et épidémiologiques de la maladie, et unifie ses différentes appellations (pseudopeste des rongeurs, fièvre de la mouche du cerf, etc.…) sous un même vocable. Le terme tularémie est alors consacré. En 1924, Parker, Spencer et Francis mettent en évidence le caractère vectoriel de la maladie et le rôle de la tique *Dermacentor andersoni*. L'espèce *Bacterium tularensis* est renommée *Francisella tularensis* en hommage aux travaux de Francis.

La haute virulence de ce pathogène en fait un agent potentiel du bioterrorisme et de la menace biologique(5). En France, la tularémie est de nouveau une maladie à déclaration obligatoire depuis 2002.

2.2. Le genre Francisella :

2.2.1. Taxonomie

Francisella est le seul genre de la famille des *Francisellaceae(6)*. L'étude de l'ARN 16S a montré que le genre *Francisella* appartient au groupe gamma des *Proteobacteria.* Les

pathogènes humains les plus proches sur le plan phylogénique sont des bactéries intra cellulaires (*Coxiella burnetii* et *Legionella pneumophila*).

Il existe actuellement quatre espèces : *Francisella tularensis*, *Francisella philomiragia, Francisella noatunensis* et *Francisella hispaniensis*. Au sein de l'espèce *F. tularensis*, on distingue 4 sous espèces : *tularensis* (biovar A), *holartica* (biovar B)*, novicida* et *mediasiatica*. Ces sous espèces sont très proches au point de vue phylogénétique, mais différentes en terme de virulence. Les cas humains de tularémie sont dus aux biovars A et B, le premier étant le plus pathogène.

2.2.2. Bactériologie :

Ce sont des petits coccobacilles à Gram négatif (0,2 µm de large, 0,2 à 0,7 µm de long), immobiles, non sporulés, aérobies stricts(6). La réaction de catalase est négative, et celle de l'oxydase faiblement positive. On peut retrouver la présence d'une capsule chez les sous espèces *tularensis* et *holartica,* intervenant dans la virulence de la bactérie. Une des particularités de *F. tularensis* est la composition en acides gras de paroi. Il en résulte chez la bactérie des propriétés endotoxiniques réduites (lipopolysaccharide sans activité toxique). Il s'agit d'un germe fastidieux, qui nécessite des milieux enrichis en cystéine pour sa culture. *F. tularensis* est une bactérie intracellulaire facultative du macrophage. Sa culture est possible *in vitro* dans des macrophages alvéolaires ou péritonéaux de souris, ou dans des lignées cellulaires (macrophages-like P388D1, cellules fibroblastiques humaines HEL).

La bactérie résiste au froid et peut persister plusieurs mois dans l'environnement. Cependant elle est inactivée par la chaleur (30 minutes à 56°C).

Le génome a été entièrement séquencé(7). Il est assez caractéristique, du fait de sa petite taille (1,89 millions de paire de bases) et sa faible teneur en GC (33%).

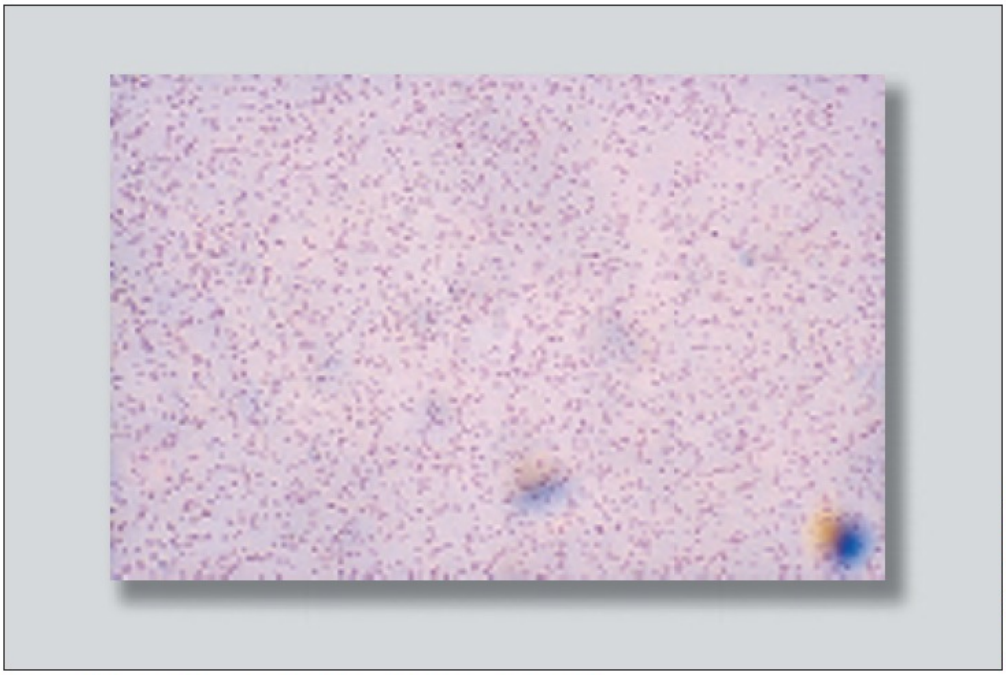


Figure 10 : *F. tularensis :* coloration de Gram *(G X 1000).*

Figure 1 : Coloration de Gram : petits coccobacilles à Gram négatif(8)

2.3. Epidémiologie

2.3.1. Répartition géographique

La tularémie n'a été quasi observée que dans les zones boisées de l'hémisphère nord(6). Cependant il existe des cas anecdotiques dans l'hémisphère sud (Soudan(9), Australie(10)), témoignant du caractère émergent de la tularémie.

L'incidence varie d'une région à l'autre. Elle est endémique en Amérique du Nord, en Europe, et en Asie. Exception faite de *F. tularensis* subsp. *novicida* qui a été isolée en Australie (L'implication de cette sous- espèce en pathogénie est exceptionnelle). Il existe des formes plus sévères sur le continent nord américain (type A : *F. tularensis* subsp. *tularensis*). Un variant moins virulent (type B : *F. tularensis* subsp. *holartica*) est présent en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. Le biovar A, a été néanmoins isolé en Slovaquie en 1998 chez des arthropodes (11). *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* n'a été retrouvé qu'en Asie centrale.

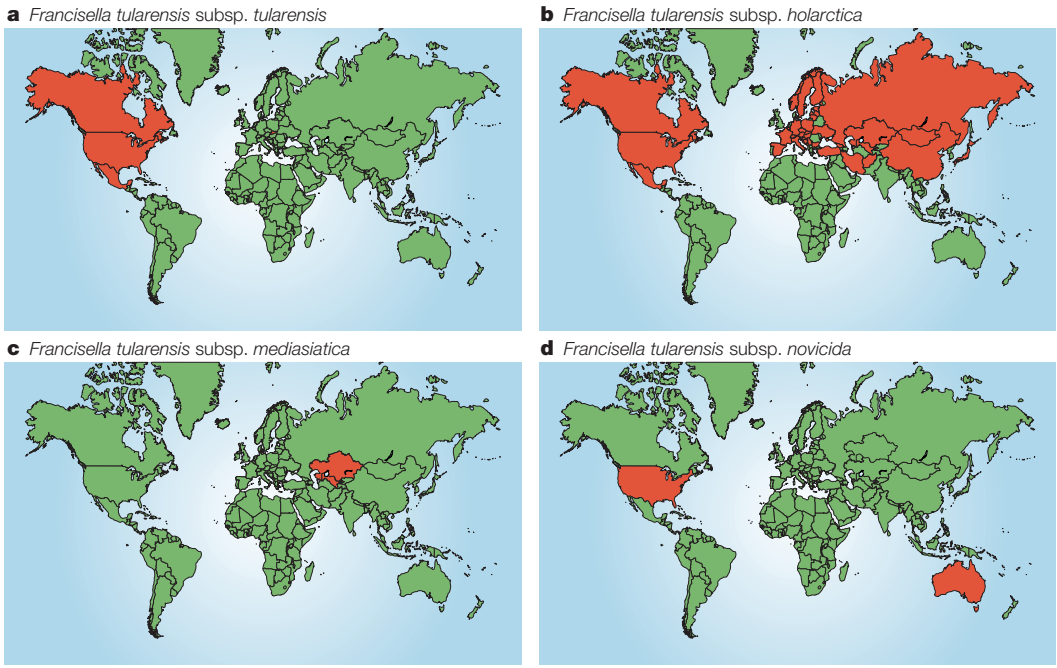


Figure 2 | **Worldwide incidence map of the four main *Francisella* subspecies.** Regions where tularaemia has been reported are shown in red.

Figure 2 : Répartition mondiale de *F. tularensis(12)*

Le profil de la maladie peut être sporadique, ou épidémique. Au niveau mondial, il existe de nombreux foyers d'endémicité(6). Sur le continent américain les Etats Unis et le Canada sont régulièrement touchés. On rapporte régulièrement des cas en Chine et au Japon. En Europe, on décrit de nombreux foyers dans les pays scandinaves et les pays de l'est. La maladie est plus rare en Europe de l'ouest. Concernant la France, les cas sont souvent sporadiques et sont décrits surtout dans les régions de l'ouest, du centre, en Alsace et en Rhône Alpes. Curieusement, il semble que ces cas, même s'ils sont sporadiques, appartiennent à un même cluster épidémique (13)(clone).

Il semble que la tularémie soit une maladie émergente(14), comme en témoignent les récentes épidémies à *F. tularensis* subsp. *holartica* en Europe (Portugal, Espagne, Norvège, Suède, Turquie). Par exemple, la description récente d'épidémies en Espagne(15) est singulière ; aucun cas de tularémie n'y avait été décrit auparavant. Les cas de tularémie varient au cours du temps, et sont liées aux activités humaines. On a constaté une diminution de l'incidence de

la maladie liée à l'exode rural, et l'activité agricole. Les guerres, et les désastres naturels, peuvent augmenter l'incidence de la tularémie (Expérience récente du Kosovo(16)).

Depuis 2002, la tularémie humaine est de nouveau une maladie à déclaration obligatoire en France. Environ 30 cas par an sont notifiés, mais l'incidence est probablement sous estimée. L'année 2008 fait exception avec une centaine de cas répertoriés. (17) Une recrudescence de cas a aussi été observée, dans la population animale (lièvre) à la même période. A ce jour cette augmentation transitoire d'incidence n'est pas expliquée.

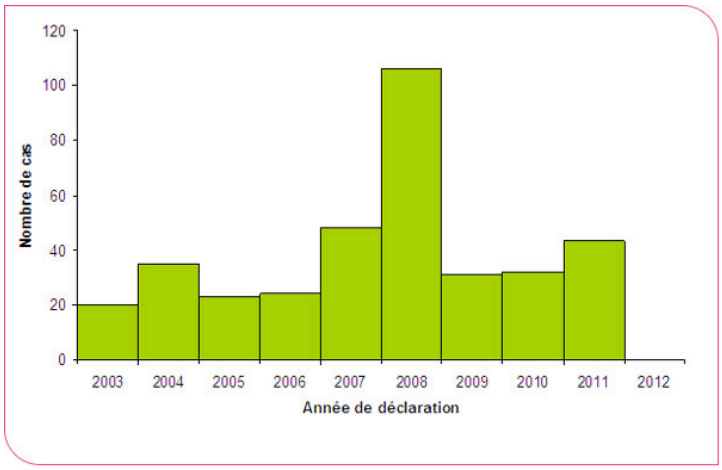


Figure 3 : Nombre de cas français notifiés à l'InVS entre 2003 et 2012 (rapport InVS 2011)

2.3.2. Incidence saisonnière et démographie

La tularémie peut survenir à tous les âges. Dans les pays endémiques, la tularémie semble saisonnière, avec des pics d'incidence de la fin du printemps (activités de plein air) et au début de l'automne (chasse). D'une année à l'autre l'incidence de la maladie est variable, et pourrait être attribuée à des facteurs climatiques (température, précipitations), et à des modifications du réservoir animal.(18)

2.3.3. Réservoir, cycle animal

Le réservoir naturel de *F. tularensis* est largement étendu dans le règne animal, vertébré ou invertébré(6). Mais il s'agit d'une zoonose transmise principalement par les petits mammifères (rongeurs aquatiques : castors, ragondins ; terrestres : écureuils, campagnols; lagomorphes : lièvre, lapin sauvage ; et insectivores : taupes). Cependant les ruminants et les carnivores ont été identifiés comme hôtes potentiels de la bactérie. L'homme est un hôte accidentel.

La transmission vectorielle est le second mode de contamination(6). De nombreux arthropodes hébergeant *F. tularensis* ont été incriminés, principalement les tiques du genre *Dermacentor* et *Amblyomma*, mais aussi les moustiques, les taons, les puces, et les poux. La prolifération de certains arthropodes pourrait favoriser l'émergence de la tularémie.

Récemment la sous espèce *holartica* a été isolée chez les chiens de prairie(19), petits rongeurs capturés aux Etats Unis. Ces nouveaux animaux de compagnie, qui ont été vendus et exportés mondialement, ont été à l'origine de cas de tularémie.

Les bactéries du genre *Francisella* sont résistantes dans le milieu extérieur, en particulier à des températures froides (6)(sol, eau, cadavres d'animaux infectés). En milieu hydrique, leur persistance pourrait être liée à une interaction symbiotique avec les amibes libres(20).

2.3.4. Transmission :

La transmission à l'homme se fait le plus souvent par voie cutanée, par piqure de tiques en zone forestière ou par contact direct avec les animaux ou un environnement contaminé. *F. tularensis* est classiquement capable de pénétrer les tissus sains, et notamment la barrière cutanée. La contamination peut se faire également par voie conjonctivale.

La transmission par voie respiratoire (aérosol) est très infectante, mais plus rare. La contamination par voie orale, par le biais d'eau ou d'aliments contaminés, est rare (hormis dans certains pays comme la Turquie), mais l'inoculum bactérien doit être plus important pour provoquer l'infection. La transmission interhumaine n'a pas été décrite à ce jour.

2.3.5. Facteurs de risque :

Les professions exposées sont : le personnel de laboratoire, les vétérinaires, les fermiers, les gardes-chasse, les paysagistes. A ce titre la tularémie est reconnue en tant que maladie professionnelle.

Dans les activités de loisirs, la pratique de la chasse est un facteur de risque important (dépeçage d'animaux sauvages). Les autres expositions à risque sont la manipulation de végétaux vulnérants, les piqures de tiques, et les loisirs en plein air (jardinage, randonnée).

En France, les facteurs de risque(21) sont principalement la pratique de la chasse, le dépeçage d'animaux sauvages (lièvres essentiellement), la consommation de viandes contaminées, et les piqures de tiques.

2.4. Diagnostic

2.4.1. Diagnostic clinique:

F. tularensis subsp. *tularensis* et *F. tularensis* subsp. *holartica* sont incriminés dans la majorité des cas humains de tularémie.

Biovar A (*F. tularensis* subsp. *tularensis*) : La sous espèce *tularensis* est la plus virulente, et seulement 10 bactéries sont nécessaires pour provoquer l'infection(5). Il s'agit d'un des

agents les plus infectieux en médecine humaine. Avant l'ère des antibiotiques, le taux de létalité était compris entre 5 et 15% dans les formes modérées de la maladie, et entre 30 et 60% dans les formes les plus graves.

Biovar B (*F. tularensis* subsp. *holartica*) : Les atteintes liées à ce variant sont moins graves, et le taux de létalité est de 1 à 3 % sans traitement et inférieur à 1% avec un traitement bien conduit. Elles sont fréquemment associées à des adénopathies suppurées. Entre 2006 et 2010, les cas identifiés par le CNR *Francisella* confirmaient cette tendance(21) (<1% de létalité). Cependant 29,7% de ces cas ont nécessité une hospitalisation. Il existe probablement un biais de recrutement, liée à l'activité d'expertise du CNR des cas les plus problématiques, pouvant expliquer le nombre important de formes graves.

La phase d'incubation varie entre 2 et 10 jours et la phase d'invasion est complètement aspécifique (syndrome pseudo-grippal). Les patients consultent habituellement suite à la découverte d'une adénopathie. Il existe diverses descriptions cliniques de la maladie(6), dépendant de la voie d'entrée de la bactérie dans l'organisme. Entre 2006 et 2010(21), les cas notifiés (n=251) à l'InVS étaient principalement des formes ulcéro-ganglionnaires (24,5%) et ganglionnaires (47%). 18% des cas notifiés correspondaient à une forme septicémique ou pulmonaire.

2.4.1.1. Forme ulcéro-ganglionnaire

Classiquement, c'est la forme clinique la plus fréquente. On retrouve la présence d'un ulcère cutané d'inoculation (morsure de tique, blessure causée par un animal infecté) et d'une adénopathie satellite.



Figure 4.1 Primary ulcer in a human case of tularaemia (reproduced with the courtesy of Department of of Infectious Diseases, Umeå University, Sweden).



Figure 4.2 Lymph node enlargement in a human case of glandular tularaemia (reproduced with the courtesy of Department of of Infectious Diseases, Umeå University, Sweden).

Figure 4 : Ulcère d'inoculation (4.1) et tularémie ganglionnaire (4.2) (WHO guidelines tularaemia)

2.4.1.2. Forme ganglionnaire

Une adénopathie régionale est présente, mais on ne retrouve pas d'ulcère cutané. De ce fait le diagnostic de tularémie est souvent difficile à poser, devant une forme ganglionnaire pure.

2.4.1.3. Forme oculo-ganglionnaire :

C'est une forme rare (5% des cas). La porte d'entrée de l'infection est conjonctivale et on retrouve l'association conjonctivite et adénopathie satellite. (Syndrome oculo-ganglionnaire de Parinaud)

2.4.1.4. Forme oro-pharyngée

C'est une forme peu fréquente. Elle survient après l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Le tableau clinique correspond à une pharyngite chronique, associée à une

sécheresse buccale et une sensation de brulure caractéristiques. Le diagnostic est difficile à poser.

2.4.1.5. Forme pulmonaire

C'est une forme clinique rare. Elle survient après exposition à un aérosol contaminant la plupart du temps. Cependant la forme pulmonaire peut être due à une dissémination hématogène des bactéries. Cette atteinte est redoutable et redoutée, en particulier dans le cadre du bioterrorisme. La mortalité peut atteindre 30 à 60% chez l'espèce *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

Les formes pulmonaires (9,2%) identifiées par le CNR entre 2006 et 2010 (21), correspondaient à un tableau beaucoup moins sévère que celles décrites lors des épidémies de Martha's Vineyard(22) (Biovar A). En Europe de l'ouest il pourrait exister deux tableaux cliniques : une forme aigüe (de sévérité moyenne, régressant rapidement sous antibiothérapie), et une forme chronique (altération de l'état général, adénopathies médiastinales, posant le problème du diagnostic différentiel avec la tuberculose, et la sarcoïdose).

2.4.1.6. Forme typhoïdique

C'est une forme septicémique peu fréquente, qui peut être associée à une forme digestive. Elle est liée à une contamination avec une charge bactérienne importante. Les formes typhoïdiques identifiées par le CNR, concernaient des patients âgés(21) (moyenne d'âge 76,3 ans). Il peut y avoir des localisations pulmonaires secondaires.

2.4.1.7. Autres manifestations cliniques :

Des présentations cliniques plus anecdotiques existent : méningite, pleurésie, péricardite, endocardite, péritonite.

F. tularensis subsp. *mediasiatica* a été isolé en Asie centrale chez des tiques et des animaux, et est très rarement impliqué en pathologie humaine. Le rôle pathogénique de *F. tularensis* subsp. *novicida* est aussi limité, mais décrit. *F. philomiragia* aurait été isolé, chez l'homme dans un contexte d'immunodépression (granulomatose septique, syndrome myéloprolifératif), et de noyade. *F. noatunensis* n'a été isolé que chez les poissons (cabillaud). Un cas de septicémie à *F. hispaniensis* a été décrit en Espagne.

2.4.1.8. Diagnostic différentiel

Les infections provoquées par *F. tularensis* sont très polymorphes. L'absence de spécificité des signes cliniques de la tularémie peut rendre son diagnostic difficile. La reconnaissance d'un contexte clinique évocateur est important (loisirs, pathologie d'inoculation). Les diagnostics différentiels sont nombreux, en fonction des tableaux envisagés.

Forme ulcéro glandulaire :

On doit éliminer une pathologie d'inoculation (bartonellose, pasteurellose), et une infection à pyogènes (Streptocoque, Staphylocoque).

Forme glandulaire :

Les infections virales doivent être éliminées : CMV, EBV, HIV, ainsi que les mycobactérioses. Il faut faire le distinguo avec une étiologie maligne (lymphome).

Forme oropharyngée :

Le tableau clinique est celui d'une angine, il faut éliminer les nombreuses causes d'angines virales (mononucléose infectieuse) et bactériennes (streptococciques). Souvent une bétalactamine est prescrite dans ce contexte d'angine, inefficace sur *F. tularensis*.

Forme pulmonaire :

Le tableau est celui d'une pneumopathie atypique. Les étiologies sont nombreuses. Dans un contexte de bioterrorisme, il faut savoir éliminer l'anthrax et la peste, du fait de l'atteinte clinique grave. Les autres agents responsables sont : mycoplasmoses, chlamydioses, coxielloses, légionelloses…

TABLE 1. Differential diagnosis of tularemia

Ulceroglandular form	Respiratory form
Staphylococcal skin lesions	Brucellosis
Streptococcal skin lesions	Hantavirus disease
Anthrax	Leptospirosis
HIV disease	Influenza
CMV disease	Mycoplasma pneumonia
EBV disease	Legionellosis
Pasteurellosis	TWAR (Chlamydia trachomatis pneumonia)
Mycobacteriosis	Psittacosis
Rickettsiosis	Anthrax
Toxoplasmosis	Q fever
Cat-scratch disease	Plague
Plague	SARS
Lymphoma	

Tableau 1 : Diagnostics différentiels de la tularémie(23)

2.4.1.9. Complications

Sans traitement antibiotique, la mortalité est de 5 à 10% pour le type A (surmortalité dans les formes pulmonaires), et inférieure à 1% pour le type B.

Nous rappelons que les formes liées au biovar A peuvent être responsables de complications graves, notamment associées aux formes pulmonaires fulminantes. Des défaillances multiviscérales sont rapportées : septicémie, méningite, endocardite, insuffisance rénale. Les complications à type de coagulation intra vasculaire disséminée sont possibles dans un contexte de sepsis.

Les formes liées au biovar B provoquent plutôt des complications locales. Chez 30% des patients présentant une adénopathie régionale, l'évolution se fait vers la suppuration, avec parfois fistulisation cutanée. Cette complication peut survenir malgré l'administration d'un traitement adapté, entrainant des échecs thérapeutiques et des rechutes. La guérison s'obtient habituellement après mise à plat chirurgicale de l'abcès. (21)

2.4.2. Diagnostic biologique

Le diagnostic est surtout sérologique et moléculaire.

2.4.2.1. Examen direct :

L'examen direct, avec coloration de Gram est très peu contributif, du fait de la petite taille de la bactérie. La coloration de May Grünwald Giemsa est plus adaptée.

2.4.2.2. Culture

La culture de la bactérie est fastidieuse et nécessite des milieux enrichis en cystéine, ou avec un mélange nutritif (PolyVitex, IsoVitalex). On peut utiliser aussi le milieu BCYE utilisé pour

isoler les *Legionella*. Les milieux historiques recommandés sont celui de Françis, et celui de MacCoy et Chapin. Les espèces *novicida, philomiragia*, et *noatunensis* ne nécessitent pas de cystéine pour leur culture. Les milieux doivent être incubés au minimum 10 jours à 37°C en aérobiose sous une atmosphère enrichie en CO_2 (5%). L'utilisation d'une gélose sélective sensibilise les cultures en cas de prélèvement polymicrobien. On peut augmenter la sensibilité de la culture en utilisant des milieux de transport. Les cultures en milieu liquide sont possibles (Thyoglycolate enrichi en cystéine, milieu cœur-cervelle), mais nécessitent une supplémentation d'1 à 2% de PolyVitex. Lors de sub-cultures, les colonies apparaissent après 48 à 96 heures d'incubation. Il faut rappeler qu'il s'agit d'une bactérie hautement contagieuse, et sa manipulation doit être effectuée en laboratoire de niveau 3 de sécurité biologique.(1)

L'isolement de la bactérie est possible à partir de prélèvements cutanés, de suppurations, de biopsies ganglionnaires ou à partir du sang. La sensibilité de la culture a été évaluée à moins de 25% à partir d'écouvillonnages d'ulcères cutanés(24), lors de forme ulcéro- glandulaire de tularémie.

Les caractères d'orientation sont l'oxydase négative, la catalase faiblement positive, l'uréase négative, et la nitrate réductase négative. La coloration de Gram (sur les cultures) met en évidence un petit coccobacille à Gram négatif. L'antibiogramme, quoique rarement réalisé, peut être évocateur, du fait de la résistance aux céphalosporines de 3éme génération. L'identification peut se faire après isolement de la bactérie, soit à partir d'un immun-sérum spécifique (agglutination, Difco- BD), soit à partir de galeries biochimiques (API NH, Vitek2 de bioMérieux). Elle est actuellement confirmée par biologie moléculaire, notamment pour définir la sous-espèce en cause.

2.4.2.3. Sérologie

Les tests sérologiques sont réalisés en première intention. Ce sont des techniques simples à mettre en route, permettant de confirmer la suspicion d'une tularémie. On utilise des tests de séroagglutination (macro et microagglutination), et d'immunofluorescence. Le seuil significatif est de 1 :160 en macroagglutination, et de 1 :125 en microagglutination. Des tests ELISA ont été développés plus récemment.

Les anticorps apparaissent après 2 semaines d'évolution des signes cliniques et atteignent leur titre maximal après 3 à 4 semaines(4). La séroconversion est décrite lorsque le titre d'anticorps est multiplié par 4 à au moins 15 jours d'intervalle. Les IgG peuvent persister assez longtemps après l'infection (plusieurs mois à années).

Il existe des réactions croisées, notamment en IgM (*Brucella, Proteus* OX19*, Yersinia pestis*). Le diagnostic sérologique de sous espèce n'est pas possible.

2.4.2.4. PCR

La biologie moléculaire est essentielle dans le diagnostic de la tularémie. Les techniques basées sur la PCR permettent de mettre en évidence l'ADN des bactéries, en particulier lorsque leur isolement en culture n'est plus possible (antibiothérapie préalable, prélèvements tardifs). La sensibilité de la PCR a été évaluée à 75% au cours de formes ulcéro-glandulaires(25). L'utilisation de la PCR en temps réel (26) permet actuellement un diagnostic moléculaire rapide et sensible. La détection est possible à partir du sang, de biopsies ganglionnaires et de suppurations cutanées(25). Entre 2006 et 2010 (21), l'utilisation d'une PCR en temps réel a permis de confirmer le diagnostic dans 38,6% des cas expertisés au CNR *Francisella*. L'intérêt clinique de ce test pour les prélèvements tissulaires

(adénopathies) est indéniable, avec plus de 93% de positivité, alors que la culture n'est que rarement positive (6% des cas au CNR).

Il existe de nombreuses cibles moléculaires d'amplification. L'identification du genre *Francisella* peut se faire grâce aux gènes *fopA* et *tul4* qui codent pour des protéines membranaires ; à la séquence d'insertion IS*ftu2* ; au gène qui code pour une protéine de 23kDa (protéine induite pendant l'infection macrophagique (23)). La cible IS*ftu2 (26)* est particulièrement intéressante, car elle est répétée de nombreuses fois dans le génome de *Francisella,* augmentant donc la sensibilité de la PCR. Le diagnostic de sous espèce se fait notamment sur le séquençage de la région inter génique de l'ARN 16S-23S.

2.4.2.5. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Cette technique « nouvelle » est intéressante pour la caractérisation des bactéries du genre *Francisella* jusqu'au niveau des sous espèces, et donne de bons résultats(27). Cependant l'identification ne peut se faire que sur des bactéries isolées en culture, ce qui pose le problème du caractère fastidieux et potentiellement dangereux de la culture de ces microorganismes(1).

2.5. Sensibilité aux antibiotiques

2.5.1. Détermination de la sensibilité in vitro

2.5.1.1. Antibiogramme en milieu solide

La méthode conventionnelle de l'antibiogramme en diffusion, utilisant des disques imprégnés d'antibiotiques, n'est pas adaptée à la croissance fastidieuse de ce germe. De plus il n'y a pas de corrélation entre les diamètres d'inhibition et les CMI.

L'antibiogramme par bandelette E-test (CMI) a été utilisé, soit sur milieu gélosé de Mueller Hinton II, soit sur milieu Chocolat supplémenté avec 2% d'IsoVitaleX. Une étude utilisant cette méthode a été évaluée(28), donnant de bons résultats.



photo : E. Valiolo - J.C. Paucod (CRSSA)

Figure 13 : **Détermination de la CMI par E-test sur un milieu de Mueller-Hinton enrichi (Isovitalex®) après 48 h d'incubation à 37°C**
EM, érythromycine ; SM, streptomycine ; IP, imipénème

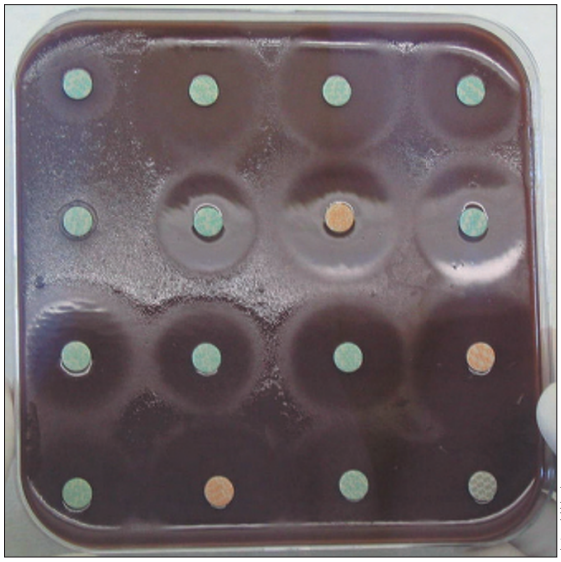


photo : J. Valsiaire

Figure 12 : **Antibiogramme par diffusion sur une gélose Mueller Hinton chocolat Poyvitex® (méthode des disques)**

Liste des antibiotiques de gauche à droite et de haut en bas :
rangée 1: Amoxicilline, Ticarcilline, Pipéracilline, Céfépime
rangée 2 : Céfalotine, Amoxicilline + acide clavulanique, Doxycycline, Pipéracilline + tazobactam
rangée 3 : Céfoxitine, Céfuroxime, Ticarcilline + acide clavulanique, Tétracycline
rangée 4 : Méropénème, Minocycline, Céfotaxime, Streptomycine.

Figure 5 : Antibiogrammes sur milieu de Mueller-Hinton enrichi par méthode E-test , et sur milieu chocolat Polyvitex par méthode des disques(8)

2.5.1.2. Antibiogramme en milieu liquide

Baker(29) a mis au point une méthode en milieu liquide (Mueller-Hinton), supplémenté en calcium, vitamines, L-cystéine, et pyrophosphate de fer. La lecture des CMI se fait après 24 heures d'incubation en aérobiose. Plus récemment le CLSI recommande d'utiliser un milieu liquide de Mueller-Hinton enrichi en cations, additionné d'un supplément polyvitaminé à 2% (ex : IsoVitaleX, Beckton Dickinson). Des concentrations critiques ont été établies par le CLSI. La pertinence de ces « breakpoints » est faible, du fait de l'incidence faible de la tularémie. La zone de sensibilité a donc été définie pour les molécules *a priori* actives sur *F. tularensis* :

-la gentamicine : ≤4 mg/L

-la streptomycine : ≤ 8 mg/L

-la doxycycline : ≤4 mg/L

-la ciprofloxacine : ≤0.5 mg/L

Les CMI obtenues avec les méthodes en milieu liquide (microdilution), et en milieu solide (E-test) sont comparables, en ce qui concerne la streptomycine, la doxycycline, et la ciprofloxacine. Cependant on constate une variation de CMI pour la gentamicine, la rifampicine, et le chloramphénicol, sans modification de la catégorisation clinique. La méthode des « E-test » a le mérite d'être moins fastidieuse.

2.5.2. Phénotype sensible

In vitro, F. tularensis est sensible aux aminosides, tétracyclines, macrolides (hormis *F. tularensis* subsp *holartica* biovar II), phénicolés, fluoroquinolones. L'efficacité des céphalosporines de 3éme génération varie en fonction des souches.

2.5.3. Activité clinique des antibiotiques

Comme *F. tularensis* est un pathogène intracellulaire facultatif, les données de CMI ne reflètent pas complètement l'efficacité thérapeutique des molécules (pénétration intracellulaire, activité intracellulaire …). L'activité des antibiotiques a été évaluée en lignée cellulaire de macrophage-like murins P388D1(30), et dans des modèles murins(31). Les molécules ayant une efficacité clinique sont les fluoroquinolones, les aminosides, les tétracyclines et plus accessoirement la rifampicine. Le taux de rechute avec les cyclines est plus important que pour les aminosides et les fluoroquinolones, vraisemblablement du fait de l'absence d'effet bactéricide. La télithromycine et l'azithromycine ont une activité bactéricide sur *F. tularensis* en modèle cellulaire, mais leur efficacité clinique n'a pas été évaluée.

2.5.4. Résistances acquises

Les nombreuses rechutes observées malgré un traitement antibiotique bien conduit pourraient être dues à l'émergence de mutants résistants *in vivo* en cours de traitement. La difficulté à cultiver la bactérie, notamment dans les formes persistantes de tularémie au cours desquelles les patients ont reçu plusieurs cures d'antibiothérapie, ne permet pas de suivre l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques de la souche incriminée au cours du temps. Il est donc difficile d'évaluer l'émergence de mutants résistants lors du traitement. On ne retrouve pas dans la littérature de résistance acquise spontanée clairement caractérisée chez *Francisella tularensis*. De rares publications font état de la possibilité de sélectionner *in vitro* des mutants résistants aux antibiotiques chez *F. tularensis*.(2, 32)

2.6. Recommandations thérapeutiques :

Fluoroquinolones :

L'ANSM (Cf. annexe 1 fiche thérapeutique tularémie AFFSAPS) recommande l'utilisation de la ciprofloxacine (1g/jour, 14 jours, chez l'adulte) en première intention. Cette fluoroquinolone a été utilisée avec succès en Europe, pour traiter des formes de gravité modérée dues au biovar B, notamment lors d'épisodes épidémiques. L'expérience clinique concernant les infections à biovar A est plus modeste.

Les autres fluoroquinolones ont une efficacité vraisemblablement comparable, mais leur efficacité clinique a été plus rarement évaluée. Un groupe d'étude américain a considéré néanmoins que la ciprofloxacine était une bonne alternative thérapeutique. (Annexe 2, (5))

Aminosides :

Les aminosides (streptomycine, gentamicine) constituent une option thérapeutique dans les formes graves(33). Elles ont une activité bactéricide importante. La streptomycine a été un des premiers antibiotiques utilisés dans le traitement de la tularémie, dans les années 1940. L'activité antibiotique était intéressante, avec un taux de guérison de 97%, sans rechute. La gentamicine (5mg/kg/jour en deux injections, pour au moins 10 jours) est préférée à la streptomycine (1g X2/jour en IM), en raison d'effets indésirables moindres (toxicité rénale, otologique), et du fait que la streptomycine n'est quasiment plus disponible sur le marché pharmaceutique. Le mode d'administration par voie systémique, et ses effets indésirables la réservent donc aux formes graves.

Tétracyclines :

Les tétracyclines sont des agents bactériostatiques sur *Francisella*. En pratique, on utilise la doxycycline (200mg/jour pendant au moins 14 jours). La possibilité d'un traitement oral et sa

diffusion intracellulaire en font une molécule intéressante, mais son action bactériostatique favorise les rechutes.(23).

Chloramphénicol :

Le traitement « historique » par le chloramphénicol est abandonné, du fait de la forte toxicité hématologique de la molécule. Cet antibiotique a une activité bactériostatique. Cependant on pourrait y avoir recours dans les méningites et encéphalites, du fait de la bonne diffusion de la drogue dans le liquide céphalo-rachidien et le tissu cérébral.

Bétalactamines :

Les bétalactamines sont inefficaces dans le traitement de la tularémie (23). Il existe une résistance naturelle aux pénicillines chez la plupart des souches de *F. tularensis*, liée à une pénicillinase chromosomique (classe A d'Ambler). La sensibilité de *F. tularensis* aux céphalosporines de troisième génération est variable en fonction des souches testées. Cependant, ces antibiotiques sont le plus souvent inefficaces *in vivo*. L'étude en modèle cellulaire confirme l'inefficacité des céphalosporines à large spectre (30).

Macrolides :

Les macrolides sont inefficaces dans le traitement de la tularémie en dépit de la sensibilité *in vitro* des souches de type A (23) ou de type B biovar II. En effet, chez les souches de type B, celles appartenant au biovar I (Europe de l'ouest, Etats-Unis, Japon) sont sensibles à l'érythromycine, alors que celles appartenant au biovar II (Europe de l'est) sont résistantes à l'érythromycine. La clindamycine est inefficace. La telithromycine (kétolide)(30) et l'azithromycine(34) ont une activité bactéricide en milieu cellulaire, et pourraient donc être considérées comme un traitement de seconde intention dans les formes modérées de

tularémie, lorsque les fluoroquinolones sont contre-indiquées. Cependant l'intérêt clinique de ces molécules n'a pas été démontré.

Autres molécules:

La rifampicine est active *in vitro*, mais non recommandée en pratique clinique, du fait de la possible sélection de mutants résistants(23). Le cotrimoxazole est inefficace. De « nouveaux » antibiotiques ont été testés, notamment le linézolide, qui est actif sur *F. tularensis in vitro*. De nombreuses données sont manquantes pour témoigner de son efficacité *in vivo*.

En définitive, les fluoroquinolones constituent un traitement de choix pour le traitement des tularémies non graves de type B, du fait de leur innocuité, leur biodisponibilité, leur importante bactéricidie, et leur mode d'administration (per os). Les fluoroquinolones semblent également actives au cours des formes plus graves liées au biovar A, mais l'expérience clinique est plus réduite.

Traitement des femmes enceintes, des enfants, immunodéprimés, prophylaxie post exposition :

Enfant : L'utilisation d'une fluoroquinolone paraît envisageable (15mg/kg, sans dépasser 1g/jour), bien que non recommandée avant l'âge de 15 ans. Le risque de toxicité osseuse semble limité. Une étude a démontré l'efficacité de la ciprofloxacine dans une série clinique de 12 enfants(35). L'utilisation de la gentamicine est conseillée en 1ére intention(5). Les tétracyclines sont à proscrire avant l'âge de 8 ans.

Femme enceinte : La FDA déconseille l'utilisation des fluoroquinolones et des aminosides. Cependant un groupe d'étude(5) a envisagé l'utilisation de la ciprofloxacine en alternative thérapeutique (Annexe 2). L'administration de cures courtes d'aminosides chez la femme enceinte peut être envisagée.

Immunodéprimé : On doit privilégier l'utilisation d'antibiotiques bactéricides, avec un aminoglycoside en première ligne(5).

Prophylaxie : En cas d'exposition avérée à *F. tularensis*, professionnelle (personnel de laboratoire) ou dans le cadre bioterroriste, l'ANSM recommande l'utilisation d'une fluoroquinolone (ciprofloxacine, 1g/jour pendant 14 jours). Le traitement doit être débuté précocement (dans les 24 heures suivant l'exposition).

3. Rappels bibliographiques sur les fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques de synthèse fréquemment utilisés en thérapeutique, depuis leur découverte « accidentelle » en 1962 par Lesher, lors de ses travaux sur la chloroquine.

3.1. Structure

Ces molécules possèdent un cycle pyridine dont l'azote peut être diversement substitué, et présentent une fonction cétone en 4 et un groupement carboxylique en 3. Ce cycle est accolé à un autre cycle aromatique variable : benzène, pyridine, pyrimidine.

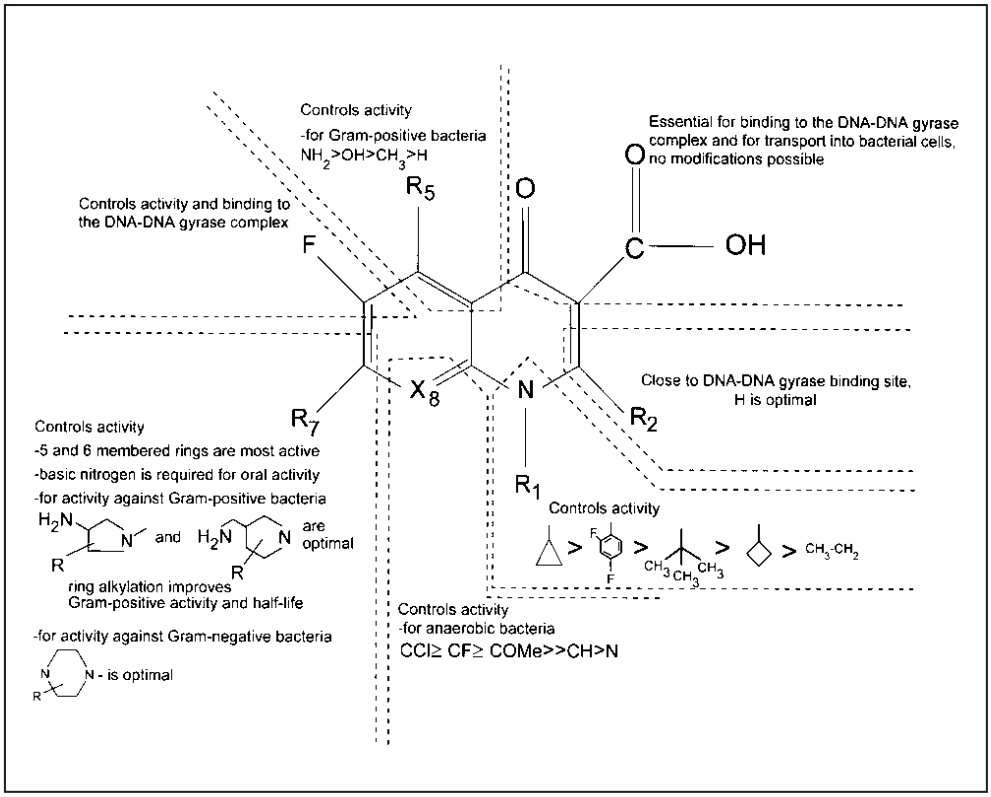
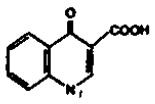


Figure 6 : Structure des fluoroquinolones(36)

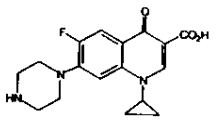
On compte 4 générations de quinolones.

1ére génération (quinolone):



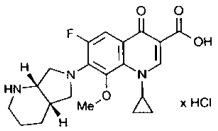
Quinolone

2éme génération (ciprofloxacine) :



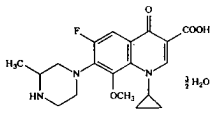
Ciprofloxacin

3éme génération (moxifloxacine) :



Moxifloxacin

4éme génération (gatifloxacine) :



Gatifloxacin

3.2. Spectre d'action et mécanisme d'action

La première génération de quinolones avait une activité réduite aux infections à entérobactéries du tractus urinaire du fait de la diffusion restreinte de ces molécules dans l'organisme. Le spectre des autres générations, correspondant aux fluoroquinolones, a été largement étendu aux bactéries à GRAM négatif et à GRAM positif. Les dernières molécules (3éme et 4éme génération) permettent en particulier de cibler le pneumocoque et les anaérobies.

Les quinolones exercent une inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur les topoisomérases de type II : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Ces deux enzymes sont impliquées dans la réplication, et la réparation de l'ADN bactérien.(3)

Inhibition de l'ADN gyrase : L'ADN gyrase est responsable du surenroulement de l'ADN. Cette compaction de l'ADN est essentielle au sein de la bactérie. Elle est composée de deux sous unités GyrA et GyrB, codées respectivement par les gènes *gyrA* et *gyrB*. GyrA provoque la coupure des brins d'ADN permettant un désenroulement localisé de l'ADN nécessaire à sa réplication ou à sa transcription. GyrB est responsable de l'hydrolyse de l'ATP, fournissant l'énergie nécessaire à la réaction enzymatique. En se liant aux complexes ADN-enzyme, les fluoroquinolones induisent un changement de conformation de l'ADN gyrase et bloquent le processus de coupure- ligation de cet ADN.

Inhibition de l'ADN topoisomérase IV : Elle est composée de 2 sous unités ParC et ParE, codées respectivement par les gènes *parC* et *parE*. Son rôle correspond au désenchevêtrement des ADN- fils en fin de réplication. L'interaction entre les quinolones et la topoisomérase IV stimulerait la coupure de l'ADN et inhiberait la religation.

Les fluoroquinolones ont une activité bactériostatique réversible, liée à la formation d'un complexe antibiotique-enzyme-ADN, bloquant la réplication de l'ADN. L'activité bactéricide résulte de la libération de fragments d'ADN. Ainsi les différentes lésions de l'ADN engendrées par les fluoroquinolones sont fatales pour la bactérie.

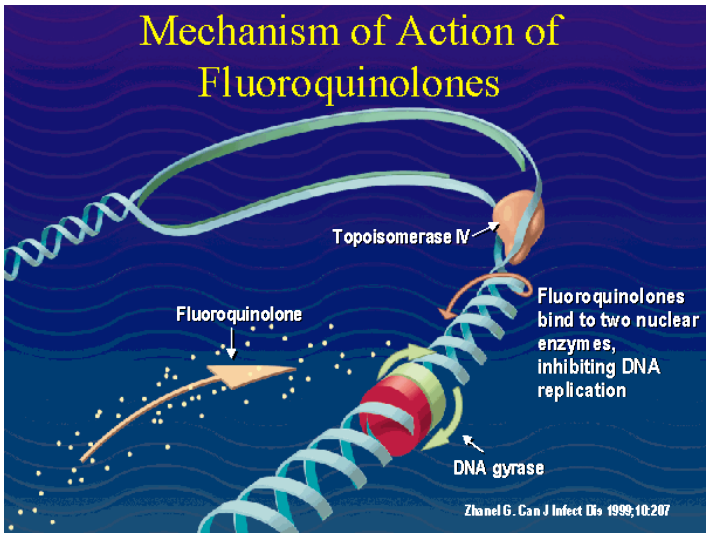


Figure 7 : Mécanisme d'action des fluoroquinolones

3.3. Caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

3.3.1. Pharmacodynamie

Ce sont des antibiotiques dont l'activité est concentration-dépendante ; de ce fait leur activité bactéricide augmente avec la concentration de l'antibiotique. De plus les fluoroquinolones ont un effet post-antibiotique important.(37)

Ces notions de pharmacodynamie sont importantes pour prévenir le développement de résistances. En effet, ces antibiotiques ont un taux de mutation élevé, notamment en monothérapie, lorsqu'ils sont utilisés à des doses sub-inhibitrices(37) (en dessous de la CMI).

3.3.2. Pharmacocinétique

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques disposant d'une excellente biodisponibilité(37), permettant une administration per os. De plus leur pénétration et leur diffusion dans les tissus sont excellentes. Les fluoroquinolones se concentrent fortement dans le milieu intra-cellulaire, et sont des antibiotiques de choix dans le traitement des infections dues aux bactéries intra-cellulaires(38). L'acidité de certains compartiments cellulaires (lysosome) diminue l'activité antibiotique des fluoroquinolones.

3.4. Mécanismes de résistance

Il existe deux mécanismes principaux de résistance bactérienne aux fluoroquinolones (3) : la modification des cibles (topoisomérases de type II) et le défaut d'accumulation d'antibiotique dans la bactérie du fait de mécanismes d'efflux .

3.4.1. Modification de la cible

Chez les bactéries à GRAM négatif, la cible principale des fluoroquinolones est le plus souvent l'ADN gyrase (sous unité A). La cible principale chez les bactéries à GRAM positif est habituellement la topoisomérase IV. Nous nous intéresserons donc principalement à l'ADN gyrase, et plus particulièrement au gène *gyrA* qui porte la plupart des mutations responsables de résistance aux fluoroquinolones.

Chez *E. coli*, les mutations du gène *gyrA* sont corrélées à une résistance clinique aux fluoroquinolones(3). Elles sont souvent localisées dans une région conservée, appelée QRDR (Quinolone Resistance Determining Region), impliquée dans la résistance aux fluoroquinolones. Ce QRDR est compris entre les acides aminés 51 à 106, et les « points chauds » des mutations sont situés au niveau des acides aminés 83 et 87. La structure cristallographique de la sous unité A de l'ADN gyrase chez *E. coli* a mis en évidence le site actif (Tyrosine 122)(39) et les interactions entre l'ADN cible et la gyrase. Ces mutations au sein du QRDR réduiraient l'affinité des quinolones pour le complexe ADN-enzyme. Des mutations à l'extérieur du QRDR ont aussi été décrites. Des mutations additionnelles peuvent survenir sur d'autres cibles : *gyrB*, *parC* et *parE*. Cependant, seules les mutations affectant *gyrA* entrainent une augmentation significative des CMIs des fluoroquinolones, avec un impact clinique potentiel.

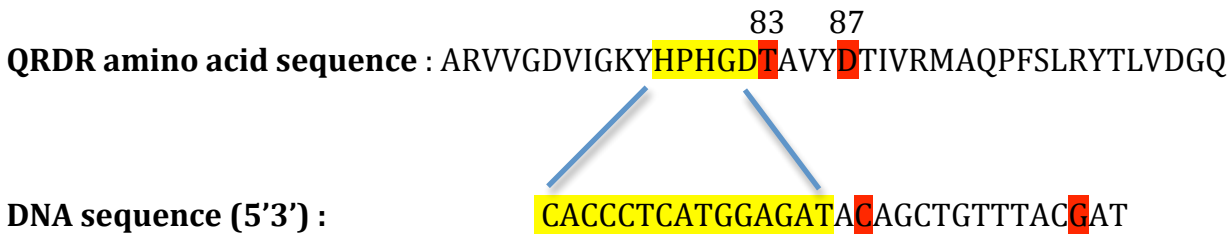


Figure 8 : Représentation du QRDR de *gyrA de F. tularensis*

Chez *Francisella tularensis,* la sélection *in vitro* de mutants résistants aux fluoroquinolones a montré que *gyrA* est également la cible privilégiée des fluoroquinolones. Loveless (2) a montré que les premières mutations à apparaître, sous pression antibiotique, concernent *gyrA*. Notre équipe a conforté ces résultats en sélectionnant plusieurs mutants résistants *in vitro* et en analysant les différentes étapes de ce processus de sélection de résistance (données en cours de publication). Les mutants sélectionnés ont un haut niveau de résistance à la ciprofloxacine (agent sélectionnant) et aux autres fluoroquinolones (lévofloxacine, moxifloxacine). Tous les mutants présentaient une modification de *gyrA*. Ces mutations n'apparaissent pas forcément en premier, mais sont corrélées à une augmentation importante des CMIs, en particulier pour les mutations affectant les acides aminés 83 et 87 de GyrA. Des modifications additionnelles (*gyrB, parC*) sont survenues chez les mutants sélectionnés dans notre laboratoire, mais avec des modifications de CMIs plus modestes.

3.4.2. Défaut d'accumulation cytoplasmique

3.4.2.1. Efflux

Ce mécanisme de résistance est très fréquent chez les bactéries(40). Il s'agit d'un mécanisme de protection : les produits toxiques, dont les antibiotiques, sont refoulés à l'extérieur de la bactérie. Les pompes à efflux ont été caractérisées et sont nombreuses. Certaines peuvent affecter plusieurs classes d'antibiotiques (pompe MDR-efflux : multidrug). Cependant leur surexpression est modeste dans le développement de la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones, avec quelques exceptions(41) (SmeDEF de *Stenotrophomonas maltophilia*).

Chez *Francisella*, une surexpression d'un mécanisme d'efflux actif est possible, et doit être accompagnée d'une modification de *gyrA* pour engendrer une résistance de haut niveau. Plusieurs systèmes d'efflux ont été décrits chez *Francisella(42)* : le système AcrAB appartenant à la famille des pompes de type Resistance-Nodulation-Division, et le système TolC-FtlC.

3.4.2.2. Défaut de pénétration

Il est lié à une imperméabilité membranaire, affectant les porines (canaux membranaires permettant la pénétration de différentes molécules, dont les antibiotiques à l'intérieur de la bactérie). Le développement de la résistance se fait par diminution de l'expression des porines (OmpF, OmpC chez *E. coli*). Elle n'a pas été décrite chez *F. tularensis.*

3.4.3. Résistance plasmidique

Le premier cas de résistance plasmidique(43) a été rapporté en 1998. Cette résistance est déterminée par le gène *qnrA*. Il s'agirait d'un mécanisme de protection de l'ADN gyrase contre les fluoroquinolones. Elle n'a pas été décrite chez *F. tularensis*.

4. Travail personnel

En Europe, les fluoroquinolones sont le traitement de première intention de la tularémie. Cependant, 10 à 15% des patients traités rechutent, suggérant la possibilité d'une sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones. Le but de cette étude était de développer un outil moléculaire permettant la détection de la résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis*, afin de détecter la présence de mutants résistants aux fluoroquinolones chez des patients en échec clinique.

Nous avons mis au point une PCR en temps réel, permettant la détection de mutations au niveau du QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *gyrA*, codant pour la sous unité A de l'ADN gyrase, principale cible des fluoroquinolones chez *F. tularensis*. La sensibilité et la spécificité de ce test ont été validées en utilisant des souches de *F. tularensis* sensibles aux fluoroquinolones, et des souches atténuées résistantes aux fluoroquinolones préalablement sélectionnées au laboratoire.

La PCR en temps réel a permis de différencier les souches sensibles des souches résistantes, d'après l'analyse des températures de fusion. Après analyse de 57 échantillons cliniques de ganglions suppurés, nous n'avons pas identifié de mutation de *gyrA*.

Notre test peut donc être utilisé en pratique clinique pour détecter les mutations de *gyrA* chez *F. tularensis* sur des souches ou directement sur des prélèvements cliniques. Cependant nos travaux indiquent que la sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones chez *F. tularensis*, après traitement, est vraisemblablement un phénomène très rare, et n'explique pas les rechutes fréquemment observées. Les mécanismes d'efflux ne sont pas complètement élucidés chez *F. tularensis* et pourraient faire l'objet d'une étude ultérieure. En définitive, le principal facteur actuellement prédictif de rechute est le retard à l'initiation d'une antibiothérapie adaptée, mais le mécanisme de ces rechutes et échecs thérapeutiques demeure inexpliqué.

Development of a Real-time PCR Assay for detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Francisella tularensis*.

G. Hoarau[1,2], V. Sutera[1,2], J-N. Del-Banõ [1], D. Schneider[2], M. Maurin[1,2]

1 Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et Pathologie, CHU de Grenoble, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, BP 217, 38043 Grenoble, France

2 LAPM, CNRS UMR 5163, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, BP 170, F-38042 Grenoble Cedex 9, France

Corresponding author:

Max Maurin

CHU Grenoble, Université Joseph Fourier, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 9, France.

Tel: +33 (0) 4 76 76 54 79; Fax: +33 (0) 4 76 76 59 12; E-mail: mmaurin@chu-grenoble.fr

Running title: Detection of fluoroquinolone resistance in *Francisella tularensis*

Keywords: *Francisella tularensis*, tularaemia, quinolone, resistance, real time PCR, GyrA

Abstract:

Objectives*:* In Europe, fluoroquinolones are considered as a first-line therapy of tularaemia. However, 10-15% of treated patients experience relapses, suggesting *in vivo* selection of fluoroquinolone-resistant mutants in *F. tularensis*. The aim of the present study was to develop a molecular tool allowing detection of fluoroquinolone resistance in *F. tularensis*, to tentatively detect fluoroquinolone-resistant mutants in clinical samples from tularaemia patients with antibiotic treatment failures.

Methods: We designed a real time PCR assay for detection of mutations occurring in the Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) of the *gyrA* gene, encoding subunit A of DNA gyrase, the main target of fluoroquinolones in *F. tularensis*. The assay was validated using fluoroquinolone-susceptible *F. tularensis* strains, and fluoroquinolone-resistant strains with *gyrA* mutations previously selected in our laboratory.

Results: The real-time PCR test allowed accurate differentiation of the wild-type strains from resistant mutants according to their respective melting temperatures. The specificity of our assay was confirmed using 32 clinical isolates of *Francisella tularensis,* characterized as wild type by sequencing of *gyrA* QRDR. We didn't find any *gyrA* mutant from clinical samples.

Conclusion: We have elaborated a new real-time PCR assay allowing accurate detection of *gyrA* mutations in *F. tularensis*. This test can now be used on a routine basis to detect fluoroquinolone resistance either in isolated *F. tularensis* strains or directly in clinical samples. Our preliminary experience, however, indicate that in vivo selection of mutants after fluoroquinolone therapy is probably a rare event, and may not explain the frequent relapses observed in tularemia patients.

INTRODUCTION

Francisella tularensis is a highly virulent Gram-negative bacterium, responsible for the zoonosis tularaemia, and classified by the CDC as a bioterrorism agent (class A) (5). Two subspecies exist: *F. tularensis* subsp *tularensis* (type A strains), the most pathogenic, found in North America; and *F. tularensis* subsp *holartica* (type B strains), less virulent, found in the whole northern hemisphere. For type B tularaemia, which usually corresponds to infections of mild to moderate severity, the fluoroquinolones (especially ciprofloxacin) are recommended as first-line drugs for treatment and prophylaxis. This is the case in France where such recommendations were addressed by the ANSM (Agence Française de Sécurité du Medicament, ex-Afssaps). The *in vivo* efficiency of fluoroquinolones is not as well documented for type B as for type A tularaemia, often corresponding to severe infections (33).

The activity of fluoroquinolones against *F. tularensis* has been demonstrated both *in vitro(44-47)* and in animal models(31). Its successful clinical use has been reported in several series of tularaemia cases (15). However, failures and relapses on antibiotic withdrawal remain frequent (21, 48), particularly in patients suffering from chronic suppurative lymphadenopathies. Several hypotheses can be proposed to explain such discrepancies between *in vitro* and *in vivo* efficacy of fluoroquinolones, including lack of penetration of the antibiotic in infected tissues, inactivation of the antibiotic because of local conditions (e.g., low pH), a high bacterial inoculum especially in case of delayed diagnosis and treatment, and *in vivo* selection for antibiotic resistance in *F. tularensis*.

Antibiotic susceptibility testing of isolated *F. tularensis* strains is not performed on a routine basis, both because the manipulation of cultures of this bacterium is hazardous(1), and because no acquired resistance to first-line drugs (fluoroquinolones, tetracyclines and gentamicin) has been described so far. On the other hand, *F. tularensis* is isolated in a

minority of infected patients, and diagnosis of tularaemia remains based on serological techniques and to a lesser extent PCR-based methodes(23). Thus, data on antibiotic susceptibilities in *F. tularensis* are scarce, and usually concern strains isolated before administration of antibiotics. Recently, the CLSI(49) (Clinical and Laboratory Standards Institute) proposed a reference method for standardization of the evaluation of the antibiotic susceptibilities of *F. tularensis*, and breakpoint concentrations for evaluation of susceptibility and resistance.

High-level resistance to fluoroquinolones in *F. tularensis* subsp. *tularensis(2)* and subsp. *holartica(32)* has been easily obtained *in vitro*, suggesting *in vivo* selection of resistance may occur. A study of the mechanisms of acquired resistance to fluoroquinolone in these *in vitro*-selected resistant mutants identified the *gyrA* gene, encoding the sub-unit A of DNA gyrase, as the main genetic support of such a resistance. (2, 32) Our team recently confirmed that mutations in type II topoisomerases encoding genes are mainly involved (unpublished data). However, we found a progressive accumulation of mutations in the four genes encoding type II topoisomerases: *gyrA* and *gyrB* for DNA gyrase, and *parC* and *parE* for topoisomerase IV. We also found that mutations leading to substitution of the amino acid at positions 83 of the protein GyrA were essential to obtain high-level resistance to fluoroquinolones. Mutations affecting amino acid 83 of GyrA are well known to be associated with fluoroquinolones resistance and have been described in many other gram-negative bacteria(3). In fact, fluoroquinolone resistance is most often related to substitutions occurring in a small region of the GyrA subunit (amino acids 51 to 106), called the QRDR (quinolone resistance determining region), and particularly in the "hot spots" amino acids 83 and 87(3). Thus, in *F. tularensis* as in many other Gram-negative bacteria, detection of mutations occurring in the *gyrA* QRDR is highly predictive of fluoroquinolone resistance.

The goal of this study was the development of a real-time PCR test for rapid detection and differentiation of mutations affecting the QRDR region of *F. tularensis gyrA*, especially those leading to amino acid substitutions at positions 83 and 87. This test was first validated using *F. tularensis* strains either susceptible or resistant to fluoroquinolones. Then, the presence of *gyrA* mutants was investigated both in human strains of *F. tularensis* and human samples collected from tularemia patients for screening of potential fluoroquinolones resistance.

MATERIAL AND METHODS

F. tularensis strains.

We used two reference strains of *F. tularensis* with low virulence in human: the Live Vaccine strain (LVS) of *F. tularensis* subsp. *holarctica* (NCTC 10857), and *F. tularensis* subsp. *novicida* strain CIP56.12 (CRBIP, lot979). Three mutants with high-level resistance to fluoroquinolones were obtained *in vitro* from these strains by serial passages with increasing concentrations of ciprofloxacin: two mutants from the LVS, Fth1P14 (C248T) and Fth2P14 (C248A + G259T); and one mutant from the CIP56.12 strain, Fn1P14 (G259T). The ciprofloxacin MICs for these strains, as determined by the CLSI procedure(49), were: 64 mg/L for Fth1P14, 32 mg/L for Fth2P14, and 64 mg/L for Fn1P14 (Ciprofloxacin CLSI breakpoint for susceptibility ≤0.5 mg/L))

We tested 32 human strains of *F. tularensis* subsp. *holartica* identified at the French Reference Center for tularemia (FRCT) between 2006 and 2011.

All *F. tularensis* strains were grown on chocolate agar plates supplemented with PolyVitex (PVX, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37°C in a 5% CO2-enriched atmosphere, in a biosafety level-3 laboratory, using appropriate safety precautions.

Control strains.

The specificity of the real-time PCR assay we developed was checked using 34 strains belonging to bacterial species other than *F. tularensis*. These included etiological agents of chronic lymphadenopathies (*Bartonella henselae*, *Mycobacterium (tuberculosis*, *scrofulaceum, avium, abcessus, intracellulare, gordonae*)), and other commensal or environmental species (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Serratia marsescens, Enterococcus faecalis, Streptococcus (pneumoniae, pyogenes, mitis) Staphylococcus* (*aureus, warneri, sciuri, epidermidis, caprae, lugdunensis, capitis, auricularis, schleiferi, hominis, haemolyticus, cohnii, intermedius*), *Micrococcus luteus, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Propionibacterium acnes, Corynebacterium striatum, Bacillus subtilis*).

Clinical specimen collection

We tested 57 clinical specimens obtained from 52 tularemia patients, and 1 hare terrine, previously found to contain *F. tularensis* subsp. *holartica* DNA at the FRCT (26). The clinical specimens included 27 lymph nodes biopsies, 18 lymph nodes suppurations, 5 sera, 6 swabs, and one blood culture. Ten patients suffered from chronic lymphadenopathies and experienced relapses after fluoroquinolone therapy (table 2). The clinical specimens were collected after administration of fluoroquinolones, especially at the time of lymphadenectomy performed because of antibiotic treatment failure.

MIC determination

The MICs of ciprofloxacin (table 3) of the strains were determined in duplicate using a microdilution technique in Mueller Hinton broth (CLSI recommendations(49)), in a 96- well microtiters plates (Beckton Dickinson). Each plate contained a two-fold serial dilution of

ciprofloxacin (range: 0.001-0.5 mg/L). The inoculum was 75 µl of a suspension that contained 10^6cfu/ml**.** Plates were incubated at 37°C in a 5% CO2 atmosphere and MICs were read after 48 h of incubation, defined as the lowest antibiotic concentration that completely inhibited growth. The strains *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enteroccus faecalis* ATCC 29212, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as controls for MIC determination.

DNA extraction

Bacterial suspensions were prepared by harvesting enough colony from each strain to obtain in 1 mL of a turbid suspension in sterile distilled water. Bacterial cells were disrupted by heating at 90°C for 30 minutes. The clinical specimens were grinded using a MagNA Lyser instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France). Then, DNA was extracted from bacterial strains and clinical specimens using the QIAmp DNA mini kit, according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Real-time PCR assay for detection of *F. tularensis gyrA* mutations (qPCR-FtgyrA)

The primers were designed in conserved regions of the *F. tularensis gyrA* gene, after alignment of eight *F. tularensis gyrA* sequences available in GenBank (*F .tularensis* subsp. *holartica*: LVS strain AM233362, OSU18 strain CP000437, FTNF002 strain CP000803; *F .tularensis* subsp. *tularensis*: SCHU4 strain AJ749949, WY96-3418 strain CP000608, NE061598 strain CP001633; *F.tularensis* subsp.*mediasiatica* : FSC147 strain CP000915; *F.tularensis* subsp. *novicida*: U112 strain CP000439). One dual hybridization probe was designed to target mutations in amino acids at positions 83 and 87 in the QRDR of *gyrA*. The nucelotide sequences of probes and primers are presented in Table 1. They were designed

using Roche LightCycler Probe Design software (Roche Diagnostics) and synthesized by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

The PCR amplification was performed in a total volume of 20 µl, containing 2 µl of LightCycler FastStart reaction mixture, 4mM $MgCl_2$, 0,5 µl UDG (Uracyl DNA Glycosylase), 0,25 µM forward primer, 0,5 µM reverse primer, 0,1 µM sensor probe, 0,3 µM anchor probe and 5 µl of DNA template. The annealing temperature and concentrations of primers, probes and $MgCl_2$ have been optimized to obtain the most discriminating melting-curve analysis. The thermal cycling were performed using LightCycler 1.0 apparatus, as follows: one cycle at room temperature for 5 minutes, one cycle of initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 sec, annealing at 60° for 10 sec, and extension at 72° for 15 sec, with a fluorescence reading taken during each annealing step. A melting curve was generated at the end of the amplification cycle by increasing the temperature from 50 to 95 °C at a programmed rate of 0.1°C/s with a continuous recording. Melting curve analysis was performed by using LightCycler 4.1 software (Roche diagnostics). Controls included a blank capillary tube (water DNA free), wild-type LVS DNA, and DNA from the three fluoroquinolones resistant mutants (Fth1P14: C248T; Fth2P14: C248A + G259T; Ftn1P14: G259T).

***gyrA* amplification and sequencing using PCR and Nested PCR assays.**

To confirm results of the RT-PCR-FtgyrA assay we amplified and sequenced the *gyrA* gene QRDR from isolated strains of *F. tularensis* and also directly from clinical samples when possible. The PCR assay used the following primers: Fwd-5'TGAATGGAATGTCAAAGAGTGC 3' and Rvs- 5'AGGAAAATCTGGAGCTGGAA 3'.

For some clinical samples with negative PCR amplification, we used a nested PCR assay using the following outer primers: Fwd-5'TGAATGGAATGTCAAAGAGTGC 3' and Rvs-

5’AGGAAAATCTGGAGCTGGAA3’ and inner primers (qPCR-FtgyrA primers, same qPCR protocol): Fwd-5‘CCATCGTCGTGTACTTTTTGC3’ and Rvs-5’ GGAGAATCACCATCAACAGAACC 3.’

The PCR and nested PCR assays were performed using the Pwo Master Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer’s instructions. Amplification reactions were carried out in 50 µl volumes containing 0.4µM of each of the reverse and forward primers and 5µL of genomic DNA. The PCRs were initiated by denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 50,5°C for 30 s and 72°C for 30 s, before a final elongation step at 72°C for 5 min. The amplified products were separated in agarose gel electrophoresis and stained using GelRed^{TM} (Biotium, distributed by VWR, Fontenay- sous - Bois, France). They were then purified on MNSU030 plates (Millipore, Molsheim, France).

DNA sequencing was performed on a CEQ 8000 device using the GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Villepinte, France). Sequence analyses were performed using the CEQ8000XL DNA analysis system (Beckman Coulter).

RESULTS

We first optimized the RT-PCR-FtgyrA test to obtain high sensitivity and specificity. The analytical sensitivity of the assay was determined by testing in triplicate ten-fold serial dilutions of a titrated DNA suspension prepared from the wide-type LVS strain. The relationship between the cycle threshold and the DNA concentration was linear over 6 log units (Figure 1). The limit of detection was 260 genome copies (i.e., 50 fg of DNA) per test (5µL of DNA extract). The RT-PCR-FtgyrA test allowed specific detection and differentiation of fluoroquinolones-susceptible wild-type strains of *F. tularensis* (*F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS and *F. tularensis* subsp. *novicida*) and fluoroquinolones resistant mutants (Fth1P14, Fth2P14, Ftn1P14). As shown on figure 2, the QRDR of all five strains

could be amplified, and the analysis of melting curves allowed differentiation of wild-type strains from mutant strains, but also the mutant strains among themselves. Four strains (LVSwt, Fth1P14, Fth2P14, Ftn1P14) were than used as controls to test clinical specimens. A target Tm was determined for these controls, by repeating the experiments and determining the inter-assay variability. The mean Tm +/- SD were 67.6°C +/- 0.25 for the LVS wild-type strain, 65.6°C +/- 0.19 for Ftn1P14 (amino acid 87 substitution), 63.2°C +/- 0.20 for Fth1P14 (amino acid 83 substitution), and 59.2°C +/- 0.31 for Fth2P14 (amino acids 83 and 87 substitutions). With DNA concentrations close to the detection limit, a bimodal melting curve was obtained (figure 3), with melting peaks at 67°C and 60°C for wild-type strains. This limitation could be overcome by performing a nested PCR (figure 4), which allowed obtaining a single melting peak at 67°C.

We then tested 32 ciprofloxacin susceptible human strains of *F. tularensis* subsp. *holartica* (Table 3), isolated from tularaemia patients in France between 2006 and 2011. DNA amplification was obtained for all strains, and the melting curves corresponded to a *gyrA* wild-type genotype in all cases. The mean Tm +/- SD was 67.5°C +/- 0.17°C, with a maximum variability of only 0.5°C between the 32 strains (inter-assay variability). These results were confirmed by amplification and sequencing of the *gyrA* QRDR, which showed a wild-type QRDR sequence for all 32 strains. The specificity of the RT-PCR-FtgyrA assay was tested against 34 strains belonging to species other than *F. tularensis*, with no amplification.

Of the 58 specimens tested, 48 could be amplified and characterized using the RT-PCR-FtgyrA test. We found a mean +/- SD Tm of 67.2 +/- 0.40 °C for the 48 specimens, corresponding to the Tm of the LVS wild-type strain. However, for 24 out of these 48

specimens, we obtained a bimodal melting curve, with a second melting peak at 62 +/- 0.75 °C (mean +/- SD), different from those of the mutants strains (59°C; 63,1°C; and 65.6°C). Samples with negative RT-PCR-FtgyrA tests or with bimodal melting curves were those with the lowest *F. tularensis* bacterial load, as evidenced by a higher crossing threshold as previously determined using a real-time PCR targeting the multi-copy insertion sequence ISFtu2(26). The detection limit of the later test was found to be ten times lower than that of the RT-PCR-FtgyrA. For the ten samples with a negative RT-PCR-FtgyrA test, the use of a nested PCR protocol allowed us to amplify *gyrA* gene in four, increasing sensitivity of amplification of *gyrA* QRDR to 89% of the tested samples. A wild-type melting curve profile was obtained for those four specimens. The nested PCR protocol also allowed us to confirm the absence of *gyrA* mutation for specimens with a bimodal melting curve. Figure 4 illustrates change of the melting curve from a bimodal to a unimodal profile when using the nested PCR protocol. To confirm results, we sequenced the *gyrA* QRDR directly from two specimens with a bimodal melting curve, and we found a wild-type DNA sequence in both cases.

DISCUSSION

We have developed a real-time PCR assay allowing detection of fluoroquinolones resistance caused by *gyrA* mutations in *F. tularensis*. This method specifically allows a sensitive and specific detection of mutations leading to the substitution of amino-acids at positions 83 and/or 87 of GyrA, the subunit A of DNA gyrase, main target of fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. Melting curve analysis of amplified products allows detection but also differentiation of these two mutations and their combination. We have validated the method with wild type and *in vitro* selected resistant mutants of *F. tularensis*. We tested 32 ciprofloxacin susceptible strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica* previously isolated from

tularaemia patients in France and characterized as wild type by sequencing of *gyrA* QRDR, and confirmed the absence of mutations. Moreover, we showed that in many cases, the presence of *gyrA* mutants can be checked directly in clinical specimens, with a sensitivity of 82% (increasing to 89% with a nested PCR protocol) for the 58 samples tested in the present study. Samples with a low DNA load were associated with bimodal melting curves, but a unimodal curve could be obtained using the nested PCR protocol, facilitating interpretation of results. LeBlanc et al (50) previously reported a bimodal pattern of melting curves for Herpes simplex virus typing (type 1 or 2) in case of low viral load. It is to be noted that we used clinical samples frozen at -80°C for months to years, and alteration of DNA during conservation may reduce sensitivity of PCR amplification and also alter the melting curve profiles.

Our test is well adapted for rapid screening of fluoroquinolone resistance in large populations of *F. tularensis* strains or clinical samples. Although it only detects *gyrA* QRDR mutations, we have previously shown *in vitro* that such mutations occur early during selection for fluoroquinolones resistance and are always present in mutants with high-level resistance to these drugs. The importance of rapid molecular testing for antibiotic resistances in biothreat agents has been previously debated in the literature(2, 51), and it is of tremendous importance for tularaemia owing to the limited current therapeutic options for this disease.

Using our RT-PCR-FtgyrA assay, we found no fluoroquinolone resistance in 32 clinical isolates of *F. tularensis*, neither in 51 clinical samples from tularaemia patients. These results were confirmed by *gyrA* amplification and sequencing in all *F. tularensis* strains tested, and in part of clinical samples. Fluoroquinolone-resistant mutant strains with mutations at codons 83 and 87 of *gyr*A could be specifically detected and differentiated. Thus our RT-PCR test can be considered as reliable for detection of these mutations.

Ten out of the 52 patients tested (table 2) suffered from therapeutic failure and/or relapses after fluoroquinolone treatment, which highly suggested the possibility of *in vivo* selection of fluoroquinolones resistant mutants. Two patients (2 and 7) had a very relevant history. The patient 7 was involved with ulceroglandular tularaemia for one month before she received ofloxacin (200 mg/day *per os*) for 20 days, and then ciprofloxacin (750 mg/day) for one month, without clinical improvement. The lymph node suppuration was sampled after 30 days of fluoroquinolone therapy, including 20 days of under-dosed treatment with ofloxacin (800mg/day are usually recommended). The patient 2 also received low doses of ofloxacin (400mg/day) for 12 days. As the activity of fluoroquinolones is concentration dependant, the administration of sub-inhibitory concentrations can promote the emergence of resistant mutants(52, 53). However, we didn't find any *gyrA* mutation in clinical samples from the ten patients treated with a fluoroquinolone (ofloxacin, ciprofloxacin), neither from the two who received low doses of ofloxacin for prolonged periods.

No chronic carriage of *F. tularensis* has been reported in humans, and there is no human to human transmission of this pathogen(23). The animal reservoir is mainly represented by a wild-life fauna, including hares and small rodents which usually do not receive antibiotics. Thus, the only way *F. tularensis* may become resistant to antibiotics corresponds to the *in vivo* selection of resistant mutants, especially topoisomerase genes mutations in patients receiving a fluoroquinolone. Our study suggests that these events either do not occur or are very rare, and probably cannot explain the frequent treatment failures and relapses observed in tularemia patients despite administration of appropriate antibiotic therapy(15, 54).

Other hypothesis for treatment failures could be the intracellular lifestyle of *F. tularensis*, but fluoroquinolones are active against *F. tularensis* both in axenic medium (44, 46, 47, 55), in cell cultures(30) and in mice(31, 56). Delay in antibiotic therapy after symptoms onset is associated with more frequent failures and relapses(21, 57). Celebi et al (57)reported an

association between treatment failures and delayed treatment, and concluded that the benefit of antibiotic therapy was limited in the late stage of tularaemia. A recent French series(21) of tularaemia cases occurring between 2006 and 2010 confirmed high rates of relapses (38.6%), including with fluoroquinolones. Chocarro et al.(48) reported relapses in 7 out of 14 patients treated with ciprofloxacin, but the authors didn't mention the interval between symptoms and treatment. In the present study, a delayed treatment was reported for 8 out of the ten patients treated with a fluoroquinolone (table2), with more than one month between the onset of symptoms and the initiation of treatment. Interestingly, Johansson et al(58) reported treatment successes with fluoroquinolones in 41/43 patients during an outbreak of tularaemia, in Sweden. The mean interval between the onset of disease and initiation of ciprofloxacin treatment was only 3.7 days (range, 0-14 days). Early administration of antibiotic therapy was correlated with rapid recognition of the disease by physicians in this highly endemic country (54). In countries with low tularaemia prevalence, early diagnosis is difficult because clinical symptoms of tularaemia are not specific. The higher rate of failures in case of treatment delay may be explained in several ways, including a higher bacterial inoculum and/or the occurrence of tissue suppuration, especially lymph node suppuration in the most common tularaemia ulcero-glandular and glandular forms. In abscesses and necrotic tissues the antibiotic activity is often reduced(59), due to poor penetration (especially in encapsulated abscesses) and partial inactivation by local acidity (pH range: 5.5-7.2, according to Wagner(59)). The activity of fluoroquinolones is also reduced in an acidic environment, particularly for intracellular microorganisms(38). The activity of ciprofloxacin was less affected by acidic pH(60) against common pathogens (*E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. aureus*). The activity of fluoroquinolones against *F. tularensis* grown in an acidic environment needs further evaluation.

The activity of antibiotics could be also reduced because of the slowed metabolism of bacteria in chronically infected tissues. As bacteria reached a quiescent phase, they could be less susceptible to antibiotics. For the same reason, the presence of viable but non culturable forms of bacteria in chronic lymphadenopathy could be associated with decreased susceptibility to antibiotics and treatment failures (61). However, Forsman(62) et al demonstrated that *F. tularensis* loses its virulence for mice when it is in a viable but non-culturable state.

We didn't give evidence of resistant mutant selection with fluoroquinolone therapy, but our cohort is too small to draw definite conclusions. Delay in treatment is a major issue to explain failures and relapses in tularaemia patients. The efficacy of an appropriate fluoroquinolone therapy is probably reduced in constituted lymph node suppurations. However, we have now the possibility to screen new *F. tularensis* strains and clinical specimens from tularaemia patients to identify fluoroquinolone resistance. Although this will have little impact for now in routine management of tularaemia patients, the availability of such a rapid test for detection of fluoroquinolone resistance is of tremendous importance in the context of biological threat.

Funding

This work was supported by the Institut de Veille Sanitaire (InVS).

Transparency declarations

None to declare

TABLES

Table 1: *gyrA* primers and probes used in this study for real-time PCR

Gene	Amplicon size	Primers/ probes	Sequence (5' 3')	Final concentration (µM/L)
gyrA	219 bp	Forward 132	CCATCGTCGTGTACTTTTTGC	0.25
		Reverse 350	GGAGAATCACCATCAACAGAACC	0.4
		Anchor 203	GGGTTGTCGGTGATGTAATCGGTAAATATC-Fluo	0.3
		Sensor 235	640LC-CCTCATGGAGATACAGCTGTTTACGATACTA-P	0.1

Table 2: Clinical data for 10 patients, with therapeutic failure of fluoroquinolones. The *gyrA* genotypes have been determined after fluoroquinolone therapy.

Patient	Age	Sex	Clinical form	Onset of symptoms	Fluoroquinolones treatment : initiation and duration	Interval between onset of symptoms and specimen collection/ treatment	Specimen/ Date of collection	Evolution	*gyrA* genotype
1	42	F	Conjonctival	14 /10/2008	28/10/2008 (8 days) Ciprofloxacin 1 g/day	2 months/15 days	LNS 11/12/2008	Failure, Lymphadenectomy	wt
2	62	F	Ulcero - glandular	20 /11/2007	21/01/2008 (12 days) **Ofloxacin 400 mg/day**	4 months/2 months	LNB 14/02/2008	Failure, Lymphadenectomy	wt
3	69	F	Ulcero - glandular	28/10/2007	28/12/2007 (15 days) Ciprofloxacin	5 months/2 months	LNS 07/03/2008	Failure, Lymphadenectomy	wt
4	17	M	Conjonctival	26/07/2007	01/09/ 2007 (15 days) Fluoroquinolone (NA)	5 months/1 month	LNS 04/09/2007 LNS 28/12/2007	Failure, Lymphadenectomy	wt wt
5	20	M	Ulcero - glandular	07/12/2007	04 /01/ 2008(15 days) Ciprofloxacin 1g/day	6 weeks/1 month	LNS 15/01/2008	Failure, Lymphadenectomy	wt
6	65	F	Ulcero - glandular	18/04/2009	25 /05/ 2009 (1 month) Ciprofloxacin	2 months/1 month	LNS 11/06/2009	Failure, Lymphadenectomy	wt
7	60	F	Ulcero - glandular	01/02/2011	10 /03/ 2011 (20 days) **Ofloxacin 200 mg/day** 29 /03/ 2011 (5 weeks) Ciprofloxacin 750 mg/day	2 months/1 month	LNS 08/03/2011 LNS 08/04/2011	Failure, Lymphadenectomy	wt wt
8	60	M	Pulmonar	15/10/2011	29/11/2011 (1 month) Ciprofloxacin 1g/day	2 months/1 month	LNS 14/12/2011	Failure, Lymphadenectomy	wt
9	53	M	Ulcero-glandular	17/09/2011	03/11/2011 (7 days) Ciprofloxacin 1g/day	2 months/6 weeks	LNB 17/11/2011	Failure, Lymphadenectomy	wt
10	45	M	Ulcero-glandular	20/05/2012	03/06/2012 (13 days) Levofloxacin 500 mg/day	8 days/ 14 days	WSC 28/05/2012 LNB 12/06/2012	Failure, Lymphadenectomy	wt wt

WSC : Wound Swab Collection
LNS : Lymph Node Suppuration
LNB: Lymph Node Biopsy
WT : wild type
NA : Not available

Table 3: Ciprofloxacin MICs of *F. tularensis* strains (CLSI breakpoint for ciprofloxacin : <0.5 mg/L)

Strains	Ciprofloxacin MIC (mg/L)
Ft 1	0,032
Ft 2	0,032
Ft 3	0,032
Ft 4	0,032
Ft 5	0,032
Ft 6	0,032
Ft 7	0,032
Ft 8	0,032
Ft 9	0,032
Ft 10	0,032
Ft 11	0,032
Ft 12	0,032
Ft 13	0,032
Ft 14	0,032
Ft 15	0,032
Ft 16	0,032
Ft 17	0,064
Ft 18	0,032
Ft 19	0,064
Ft 20	0,064
Ft 21	0,032
Ft 22	0,064
Ft 23	0,064
Ft 24	0,032
Ft 25	0,032
Ft 26	0,032
Ft 27	0,032
Ft 28	0,064
Ft 29	0,032
Ft 30	0,032
Ft 31	0,032
Ft 32	0,032

FIGURES

Figure 1. Correlation between the cycle threshold and *F. tularensis* DNA concentration using RT-PCR-FtgyrA

Figure 2. Melting peak analysis and detection of mutations in the QRDR of the *gyrA* gene (aminoacids 83 and 87). The different *gyrA* genotypes of LVS wild type (67°C), *F.tularensis* subsp *novicida* wild type (67°C), and 3 mutants (Ftn1P14: 65°C, Fth1P14: 63°C, Fth2P14: 58°C) can be differentiated according to their melting temperatures. We used the LVS and the 3 mutants in each experiment, to define melting peaks controls.

Figure 3. Effect of DNA quantities on the melting peaks profiles. These curves correspond to a 10-fold serial dilution, from initial DNA (LVS wild type) at 2.6 10^8 genomic copies. Bimodal melting peaks are observed below 2.6 10^3 genomic copies (dotted line).

Figure 4. Melting peaks of the same specimen
A: Real-time PCR assay of *gyrA* (CT>40), with bimodal melting peaks
B: Nested PCR (CT=18.83), with unique peak. The preamplification nested PCR has corrected the shape of the melting curve.

Figure 1.

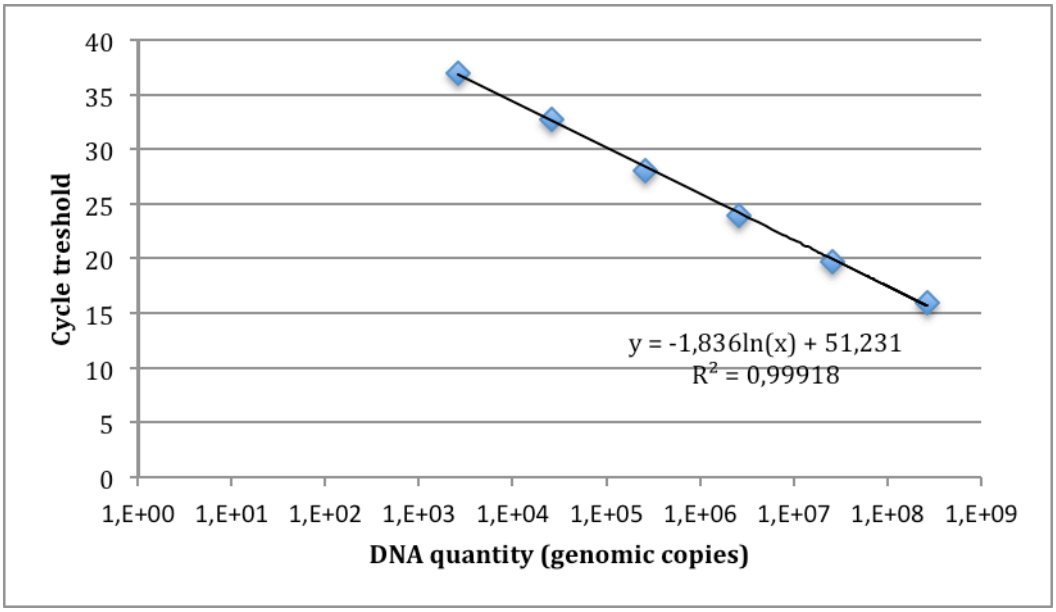


Figure2.

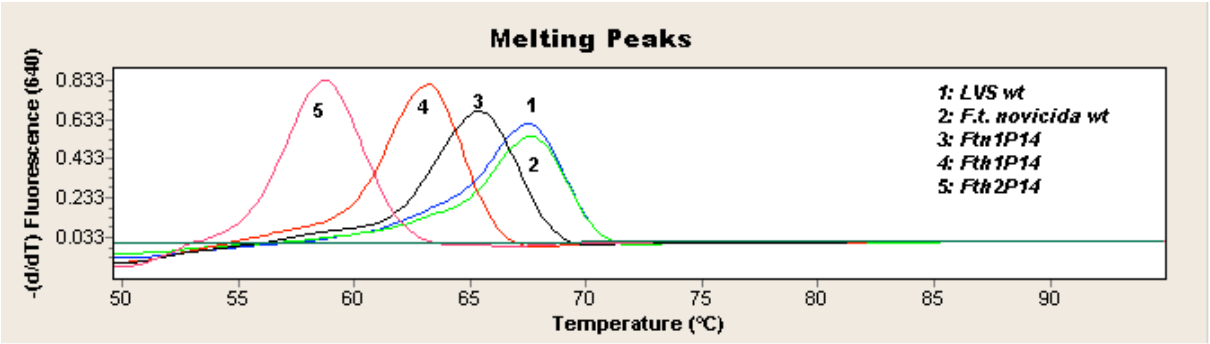


Figure 3.

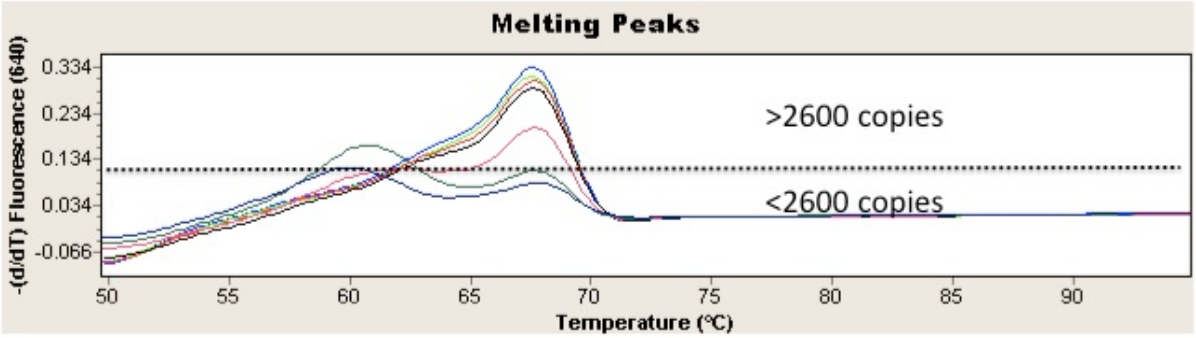
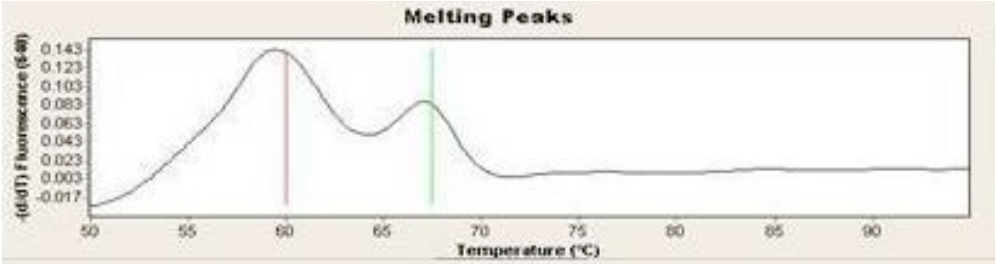
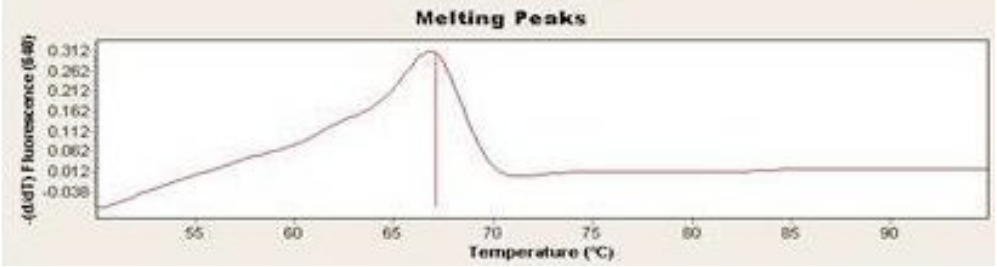


Figure 4.

A


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (5-80)
0.143
0.123
0.103
0.083
0.063
0.043
0.023
0.003
-0.017
50
55
60
65
70
75
80
85
90
Temperature (°C)

B


Melting Peaks
-(d/dT) Fluorescence (5-80)
0.312
0.262
0.212
0.162
0.112
0.062
0.012
-0.038
55
60
65
70
75
80
85
90
Temperature (°C)

5. Conclusions et perspectives

THESE SOUTENUE PAR: Gautier HOARAU

TITRE : **Recherche de mutants de *F. tularensis* résistants aux fluoroquinolones chez les patients atteints de tularémie**

CONCLUSION

Les fluoroquinolones sont le traitement de référence de la tularémie en Europe (*F. tularensis subsp. holartica*). Cependant il existe un grand nombre d'échecs cliniques et de rechutes après traitement. A ce jour, la résistance de *F. tularensis* à ces molécules n'a jamais été mise en évidence. Grace au développement d'un outil de biologie moléculaire, nous pouvons désormais identifier des mutants résistants de *gyrA*, cible principale des fluoroquinolones chez *F. tularensis*. Cependant nous n'avons pas identifié de mutations de *gyrA* lors d'authentiques échecs thérapeutiques chez des patients atteints de tularémie traités par fluoroquinolones. De ce fait l'émergence *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones ne semble pas pouvoir expliquer les échecs cliniques observés avec ces molécules chez les patients atteints de tularémie.

Nous n'avons ciblé que les mutations de *gyrA*, car *in vitro* elles sont impliquées dans la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones. Néanmoins, certains mécanismes d'efflux chez *F. tularensis* restent à être élucidés. Nous continuerons, de façon prospective à rechercher les mutations de *gyrA* chez les nouveaux patients atteints de tularémie, dans le cadre de l'activité diagnostique du Centre National de Référence des *Francisella*. Par ailleurs, cet outil permettrait de rechercher des mutants résistants aux fluoroquinolones, dans le cadre de la menace bioterroriste.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 5/8/2012

LE DOYEN
PROFESSEUR J.P.ROMANET

LE PRESIDENT DE LA THESE
PROFESSEUR J.P.STAHL

6. Annexe 1

afssaps
Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

Fiche thérapeutique

Fiche n° 4
"Tularémie"

La tularémie est une infection bactérienne due à *Francisella tularensis,* dont il existe 2 biovars : tularensis (type A) et palearctica (type B). C'est une maladie principalement animale, atteignant accidentellement l'homme à l'occasion de contact avec des animaux infectés mais aussi après piqûres de taons, de moustiques ou de tiques.

L'exposition à un aérosol contaminant serait responsable d'une forme typhoïdique ou pulmonaire.

L'incubation va de deux à dix jours (une moyenne de trois à cinq jours). La forme typhoïdique se traduit par une fièvre avec prostration. La forme pulmonaire est caractérisée par une pneumonie.

La mortalité est de 30 à 50 % pour les formes typhoïdiques, septicémiques ou pulmonaires dues au type A.

Il n'y a pas de transmission inter-humaine.

Aucun vaccin n'est disponible à ce jour.

Tout malade symptomatique doit être hospitalisé ou placé dans une structure médicalisée.

Francisella tularensis est sensible *in vitro* à de nombreux antibiotiques. Les fluoroquinolones constituent le traitement de première intention (en raison de la bonne efficacité in vitro et sur modèles animaux ainsi que pour les modalités pratiques d'utilisation de ces produits). D'autres antibiotiques comme les aminosides (streptomycine, gentamicine) utilisés historiquement dans le traitement de la tularémie sont actifs. Dans des situations cliniques sévères, une association avec un aminoside peut être envisagée.

La durée de traitement est de 14 jours mais de 21 jours en cas de traitement par doxycycline, en raison du risque de rechutes plus élevé observées avec les cyclines.

1. Traitement prophylactique post-exposition et traitement des personnes symptomatiques pouvant recevoir un traitement per os

Mise en place du traitement prophylactique dès que possible après exposition avérée.

1.1. Posologie

1.1.1. Adultes

Traitement de première intention

- ciprofloxacine per os : 1g/jour en deux prises, soit 500 mg deux fois par jour.
- ou ofloxacine per os : 800 mg/jour en deux prises, soit 400 mg deux fois par jour.
- ou lévofloxacine per os : 500 mg/jour en une prise.

Alternative
doxycycline per os : 200 mg/jour en 2 prises, soit 100 mg deux fois par jour.

1.1.2. Enfants (< 15 ans)

Traitement de première intention
ciprofloxacine per os : 10 à 15 mg/kg deux fois par jour [500 mg/prise au maximum sans dépasser la posologie adulte (1g/jour)].

Alternative
doxycycline per os : 4 mg/kg/jour en 2 prises sans dépasser la posologie adulte (200 mg/jour).

1.2. Durée de traitement

- Prophylaxie post-exposition : 14 jours (quelle que soit la molécule)
- Traitement des personnes symptomatiques pouvant recevoir un traitement oral :
  - ciprofloxacine, ofloxacine ou lévofloxacine : 14 jours
  - doxycycline : 21 jours.

2. Traitement des personnes symptomatiques devant recevoir un traitement parentéral

2.1 Posologie

2.1.1 Adultes

Traitement de première intention
- ciprofloxacine par voie intraveineuse en perfusion de 60 minutes pour la présentation 400 mg et 30 minutes pour la présentation 200 mg : 400 mg toutes les 12 heures avec relais par voie orale selon l'état du patient : 500 mg deux fois par jour.
- ou ofloxacine par voie intraveineuse en perfusion de 30 minutes: 400 mg toutes les12 heures, avec relais par voie orale selon l'état du patient : 400 mg deux fois par jour.
- ou lévofloxacine par voie intraveineuse en perfusion d'au moins 60 minutes pour la présentation 500 mg/100 ml et d'au moins 30 minutes pour la présentation 250 mg/50 ml : 500 mg une fois par jour, avec relais par voie orale selon l'état du patient : 500 mg une fois par jour.

Alternative
doxycycline par voie intraveineuse en perfusion lente de 60 minutes minimum: 200 mg pour les premières 24 heures puis 100 mg toutes les 12 heures, avec relais par voie orale selon l'état du patient : 100 mg deux fois par jour.

2.1.2 Enfants (< 15 ans)

Traitement de première intention
- ciprofloxacine par voie intraveineuse en perfusion de 60 minutes : 10 à 15 mg/kg deux fois par jour [400 mg/prise au maximum sans dépasser la posologie adulte (800 mg/jour)], avec relais par voie orale selon l'état du patient : 10 à 15 mg/kg deux fois par jour [500 mg/prise au maximum sans dépasser la posologie adulte (1g/jour)].

Alternative
doxycycline par voie intraveineuse en perfusion lente de 60 minutes minimum : 4 mg/kg/jour en 2 perfusions par 24 heures, avec relais par voie orale selon l'état du patient : 4 mg/kg /jour en 2 prises, sans dépasser la posologie adulte (200 mg/jour).

2.2 Durée de traitement

Ciprofloxacine, ofloxacine ou lévofloxacine : 14 jours
Doxycycline : 21 jours

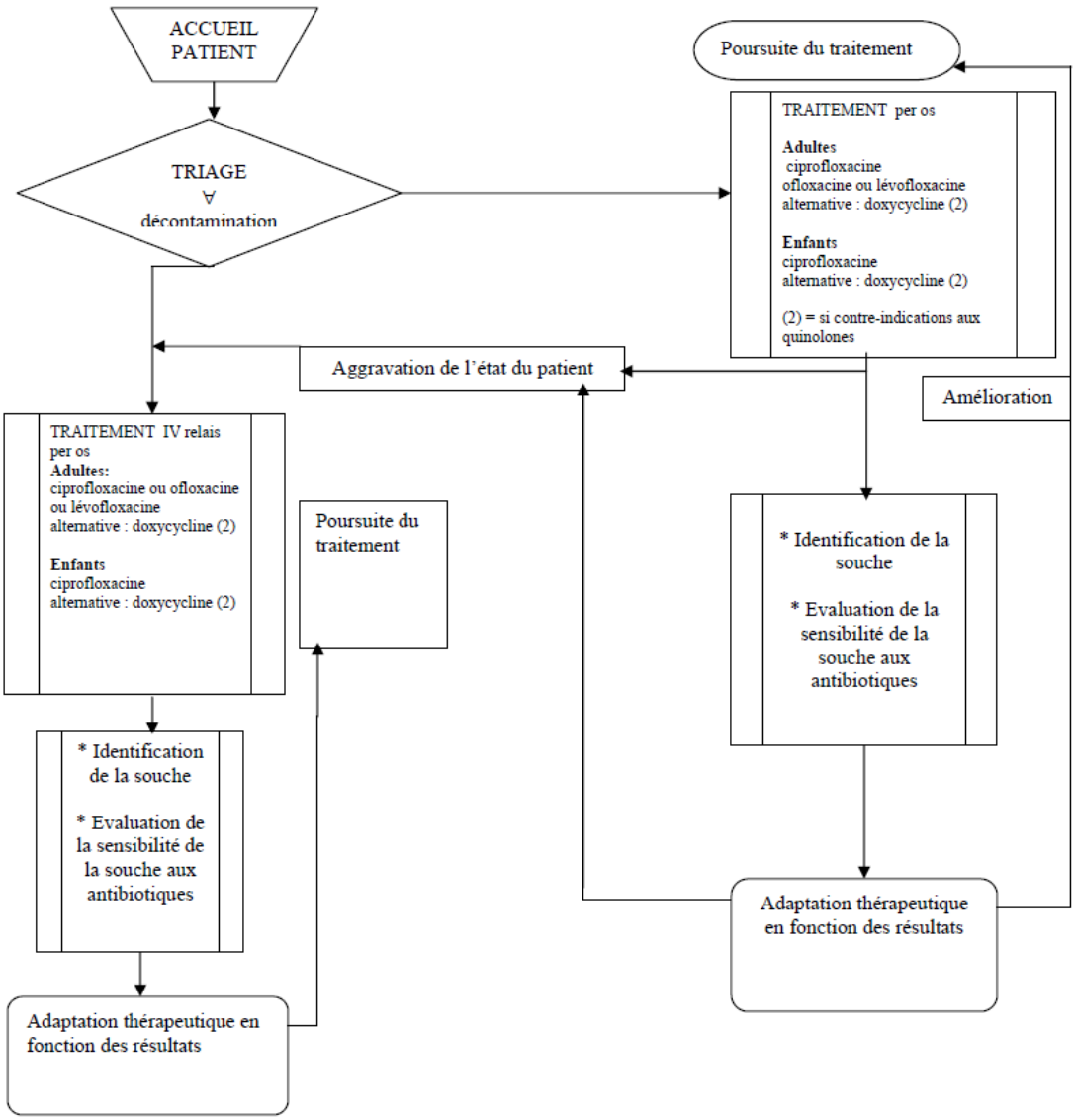
Fiche n° 4 : Tularémie

Noms des principes actifs	Hiérarchisation des traitements	Rubriques	Sujet pouvant recevoir un traitement per os	Sujet devant recevoir un traitement parentéral
ciprofloxacine	**Traitement de première intention**	**Posologie**	**Adultes** **Per os** 1 g/jour en 2 prises, soit 500 mg deux fois par jour pendant 14 jours.	**Adultes** Voie intraveineuse en perfusion de 60 minutes pour la présentation 400 mg et 30 minutes pour la présentation 200 mg : 400 mg toutes les 12 heures avec relais par voie orale selon l'état du patient : 500 mg deux fois par jour, pendant 14 jours
			Enfants Per os 10 à 15 mg/kg deux fois par jour [500 mg/prise au maximum sans dépasser la posologie adulte (1 g/jour)]	**Enfants** Voie intraveineuse en perfusion de 60 minutes : 10 à 15 mg/kg deux fois par jour [400 mg/prise au maximum sans dépasser la posologie adulte (800 mg/jour)], avec relais par voie orale selon l'état du patient : 10 à 15 mg/kg deux fois par jour [500 mg/prise au maximum sans dépasser la posologie adulte (1 g/jour)]
		Contre-indications	- Hypersensibilité à la ciprofloxacine ou à un produit de la famille des quinolones - Antécédents de tendinopathie avec une fluoroquinolone	
		Grossesse et allaitement	- Prescription possible pendant la grossesse quel que soit le terme. - Allaitement : en raison du contexte infectieux, il est recommandé de remplacer l'allaitement maternel par un allaitement artificiel	
ofloxacine	**Traitement de première intention**	**Posologie**	**Adultes** Per os 800 mg/jour en deux prises, soit 400 mg deux fois par jour, pendant 14 jours.	**Adultes** Voie intraveineuse en perfusion de 30 minutes : 400 mg toutes les 12 heures, avec relais par voie orale selon l'état du patient : 400 mg deux fois par jour, pendant 14 jours
		Contre-indications	-Hypersensibilité à l'ofloxacine ou à un produit de la famille des quinolones ; épilepsie -Antécédents de tendinopathie avec une fluoroquinolone	
		Grossesse et allaitement	- Prescription possible pendant la grossesse quel que soit le terme. - Allaitement : en raison du contexte infectieux, il est recommandé de remplacer l'allaitement maternel par un allaitement artificiel	
lévofloxacine	**Traitement de première intention**	**Posologie**	**Adultes** Per os 500 mg/jour en une prise, pendant 14 jours.	**Adultes** Voie intraveineuse en perfusion d'au moins 60 minutes pour la présentation 500 mg/100 ml et d'au moins 30 minutes pour la présentation 250 mg/50 ml : 500 mg une fois par jour avec relais par voie orale selon l'état du patient : 500 mg deux fois par jour, pendant 14 jours
		Contre-indications	- Hypersensibilité à la lévofloxacine ou à un produit de la famille des quinolones ; épilepsie - Antécédents de tendinopathie avec une fluoroquinolone	
		Grossesse et allaitement	- Prescription possible pendant la grossesse quel que soit le terme. - Allaitement : en raison du contexte infectieux, il est recommandé de remplacer l'allaitement maternel par un allaitement artificiel	

Fiche n° 4 : Tularémie

Noms des principes actifs	Hiérarchisation des traitements	Rubriques	Sujet pouvant recevoir un traitement per os	Sujet devant recevoir un traitement parentéral
doxycycline	**Alternative**	**Posologie**	**Adultes** Per os 200 mg/jour en 2 prises, soit 100 mg deux fois par jour pendant 14 jours (tt prophylactique post-exposition) pendant 21 jours (tt personnes symptomatiques)	**Adultes** Voie intraveineuse en perfusion lente de 60 minutes minimum: 200 mg pour les premières 24 heures puis 100 mg toutes les 12 h, avec relais par voie orale selon l'état du patient : 100 mg deux fois par jour, pendant 21 jours.
			Enfants Per os 4 mg/kg/jour en 2 prises sans dépasser la posologie adulte (200 mg/jour) pendant 14 jours (tt prophylactique post-exposition) pendant 21 jours (tt personnes symptomatiques)	**Enfants** Voie intraveineuse en perfusion lente de 60 minutes minimum : 4 mg/kg/jour en 2 perfusions par 24 heures, avec relais par voie orale selon l'état du patient : 4 mg/kg /jour en 2 prises, sans dépasser la posologie adulte (200 mg/jour), pendant 21 jours.
		Contre-indications	- Allergie aux antibiotiques de la famille des tétracyclines ; association avec les rétinoïdes par voie générale en raison du risque d'hypertension intracrânienne.	
		Grossesse et allaitement	- Prescription possible au cours de la grossesse quel que soit le terme. Risque faible de coloration des dents de lait chez les enfants exposés in utero au-delà de 6 mois de grossesse. - Allaitement : en raison du contexte infectieux, il est recommandé de remplacer l'allaitement maternel par un allaitement artificiel	

Fiche n° 4 : Tularémie



7. Annexe 2

Table 2. Working Group Consensus Recommendations for Treatment of Patients With Tularemia in a Contained Casualty Setting*

Contained Casualty Recommended Therapy
Adults
Preferred choices
Streptomycin, 1 g IM twice daily
Gentamicin, 5 mg/kg IM or IV once daily†
Alternative choices
Doxycycline, 100 mg IV twice daily
Chloramphenicol, 15 mg/kg IV 4 times daily†
Ciprofloxacin, 400 mg IV twice daily†
Children
Preferred choices
Streptomycin, 15 mg/kg IM twice daily (should not exceed 2 g/d)
Gentamicin, 2.5 mg/kg IM or IV 3 times daily†
Alternative choices
Doxycycline; if weight ≥45 kg, 100 mg IV twice daily; if weight <45 kg, give 2.2 mg/kg IV twice daily
Chloramphenicol, 15 mg/kg IV 4 times daily†
Ciprofloxacin, 15 mg/kg IV twice daily†‡
Pregnant Women
Preferred choices
Gentamicin, 5 mg/kg IM or IV once daily†
Streptomycin, 1 g IM twice daily
Alternative choices
Doxycycline, 100 mg IV twice daily
Ciprofloxacin, 400 mg IV twice daily†

*Treatment with streptomycin, gentamicin, or ciprofloxacin should be continued for 10 days; treatment with doxycycline or chloramphenicol should be continued for 14-21 days. Persons beginning treatment with intramuscular (IM) or intravenous (IV) doxycycline, ciprofloxacin, or chloramphenicol can switch to oral antibiotic administration when clinically indicated.
†Not a US Food and Drug Administration–approved use.
‡Ciprofloxacin dosage should not exceed 1 g/d in children.

Table 3. Working Group Consensus Recommendations for Treatment of Patients With Tularemia in a Mass Casualty Setting and for Postexposure Prophylaxis*

Mass Casualty Recommended Therapy
Adults
Preferred choices
Doxycycline, 100 mg orally twice daily
Ciprofloxacin, 500 mg orally twice daily†
Children
Preferred choices
Doxycycline; if ≥45 kg, give 100 mg orally twice daily; if <45 kg, give 2.2 mg/kg orally twice daily
Ciprofloxacin, 15 mg/kg orally twice daily†‡
Pregnant Women
Preferred choices
Ciprofloxacin, 500 mg orally twice daily†
Doxycycline, 100 mg orally twice daily

*One antibiotic, appropriate for patient age, should be chosen from among alternatives. The duration of all recommended therapies in Table 3 is 14 days.
†Not a US Food and Drug Administration–approved use.
‡Ciprofloxacin dosage should not exceed 1 g/d in children.

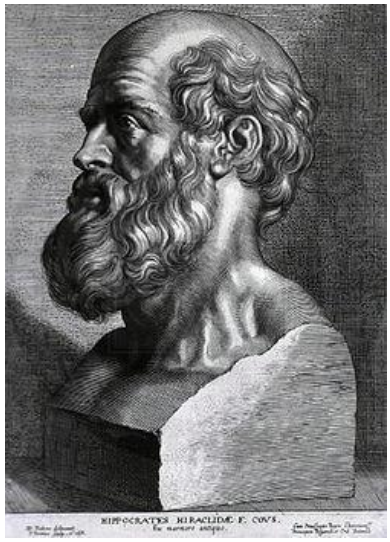
8. References

1. Shapiro DS, Schwartz DR. Exposure of laboratory workers to Francisella tularensis despite a bioterrorism procedure. J Clin Microbiol. 2002 Jun;40(6):2278-81. PubMed PMID: 12037110. Pubmed Central PMCID: 130659. Epub 2002/05/31. eng.
2. Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR, Kondig JP, Heine HS, 3rd, Wasieloski LP, et al. Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe, High Resolution Melt and Pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents: Bacillus anthracis, Yersinia pestis and Francisella tularensis. Mol Cell Probes. 2010 Jun;24(3):154-60. PubMed PMID: 20100564. Epub 2010/01/27. eng.
3. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis. 2005 Jul 15;41 Suppl 2:S120-6. PubMed PMID: 15942878. Epub 2005/06/09. eng.
4. Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, McGee ZA. Tularemia: a 30-year experience with 88 cases. Medicine (Baltimore). 1985 Jul;64(4):251-69. PubMed PMID: 3892222. eng.
5. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 2001 Jun 6;285(21):2763-73. PubMed PMID: 11386933. Epub 2001/06/21. eng.
6. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. Clin Microbiol Rev. 2002 Oct;15(4):631-46. PubMed PMID: 12364373. Pubmed Central PMCID: 126859. Epub 2002/10/05. eng.
7. Larsson P, Oyston PC, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius HH, et al. The complete genome sequence of Francisella tularensis, the causative agent of tularemia. Nat Genet. 2005 Feb;37(2):153-9. PubMed PMID: 15640799. eng.
8. J V, A LC. *Francisella tularensis* et tularémie. In: Bioforma, editor. Des agents trés spéciaux en bactériologie2007. p. 12-54.
9. Mohamed SE, Mubarak AI, Alfarooq LO. Francisella tularensis Bacteremia: A Case Report from Sudan. Case Rep Infect Dis. 2012;2012:405737. PubMed PMID: 22830063. Pubmed Central PMCID: PMC3399349. ENG.
10. Jackson J, McGregor A, Cooley L, Ng J, Brown M, Ong CW, et al. Francisella tularensis Subspecies holarctica, Tasmania, Australia, 2011. Emerg Infect Dis. 2012 Sep;18(9):1484-6. PubMed PMID: 22931809. eng.
11. Gurycová D. First isolation of Francisella tularensis subsp. tularensis in Europe. Eur J Epidemiol. 1998 Dec;14(8):797-802. PubMed PMID: 9928875. eng.
12. Oyston PC, Sjostedt A, Titball RW. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis. Nat Rev Microbiol. 2004 Dec;2(12):967-78. PubMed PMID: 15550942. eng.
13. Li W, Raoult D, Rolain JM, La Scola B. Evidence of circulation of an epidemic strain of Francisella tularensis in France by multispacer typing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Sep;30(9):1135-8. PubMed PMID: 21611870. Epub 2011/05/26. eng.
14. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann N Y Acad Sci. 2007 Jun;1105:1-29. PubMed PMID: 17395726. eng.
15. Perez-Castrillon JL, Bachiller-Luque P, Martin-Luquero M, Mena-Martin FJ, Herreros V. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. Clin Infect Dis. 2001 Aug 15;33(4):573-6. PubMed PMID: 11462198. Epub 2001/07/20. eng.
16. Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, Jorgensen TR, Cotter B, Lieftucht A, et al. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. Emerg Infect Dis. 2002 Jan;8(1):69-73. PubMed PMID: 11749751. Pubmed Central PMCID: PMC2730257. eng.

17. Mailles A, Madani N, Maurin M, Garin-Bastuji B, Vaillant V. [Unexpected increase of human and animal tularemia cases during winter 2007/2008 in France: Emergence or short-lasting episode?]. Med Mal Infect. 2010 May;40(5):279-84. PubMed PMID: 20044227. Epub 2010/01/02. Exces de cas humains et animaux de tularemie en France au cours de l'hiver 2007-2008 : emergence ou phenomene isole ? fre.
18. Nakazawa Y, Williams R, Peterson AT, Mead P, Staples E, Gage KL. Climate change effects on plague and tularemia in the United States. Vector Borne Zoonotic Dis. 2007;7(4):529-40. PubMed PMID: 18047395. eng.
19. Avashia SB, Petersen JM, Lindley CM, Schriefer ME, Gage KL, Cetron M, et al. First reported prairie dog-to-human tularemia transmission, Texas, 2002. Emerg Infect Dis. 2004 Mar;10(3):483-6. PubMed PMID: 15109417. Pubmed Central PMCID: PMC3322778. eng.
20. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M. Survival and growth of Francisella tularensis in Acanthamoeba castellanii. Appl Environ Microbiol. 2003 Jan;69(1):600-6. PubMed PMID: 12514047. Pubmed Central PMCID: 152416. Epub 2003/01/07. eng.
21. Maurin M, Pelloux I, Brion JP, Del Bano JN, Picard A. Human tularemia in France, 2006-2010. Clin Infect Dis. 2011 Nov;53(10):e133-41. PubMed PMID: 22002987. Epub 2011/10/18. eng.
22. Feldman KA, Enscore RE, Lathrop SL, Matyas BT, McGuill M, Schriefer ME, et al. An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. N Engl J Med. 2001 Nov;345(22):1601-6. PubMed PMID: 11757506. eng.
23. Tarnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. Ann N Y Acad Sci. 2007 Jun;1105:378-404. PubMed PMID: 17468229. Epub 2007/05/01. eng.
24. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tärnvik A. Detection of Francisella tularensis in ulcers of patients with tularemia by PCR. J Clin Microbiol. 1997 May;35(5):1045-8. PubMed PMID: 9114378. Pubmed Central PMCID: PMC232700. eng.
25. Johansson A, Berglund L, Eriksson U, Göransson I, Wollin R, Forsman M, et al. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):22-6. PubMed PMID: 10618057. Pubmed Central PMCID: PMC86009. eng.
26. Versage JL, Severin DD, Chu MC, Petersen JM. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of Francisella tularensis in complex specimens. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5492-9. PubMed PMID: 14662930. Pubmed Central PMCID: 309004. Epub 2003/12/10. eng.
27. Seibold E, Maier T, Kostrzewa M, Zeman E, Splettstoesser W. Identification of Francisella tularensis by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. J Clin Microbiol. 2010 Apr;48(4):1061-9. PubMed PMID: 20181907. Pubmed Central PMCID: 2849607. Epub 2010/02/26. eng.
28. Valade E, Vaissaire J, Merens A, Hernandez E, Gros C, Le Doujet C, et al. Susceptibility of 71 French isolates of Francisella tularensis subsp. holarctica to eight antibiotics and accuracy of the Etest method. J Antimicrob Chemother. 62. England2008. p. 208-10.
29. Baker CN, Hollis DG, Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility testing of Francisella tularensis with a modified Mueller-Hinton broth. J Clin Microbiol. 1985 Aug;22(2):212-5. PubMed PMID: 4031036. Pubmed Central PMCID: 268361. Epub 1985/08/01. eng.
30. Maurin M, Mersali NF, Raoult D. Bactericidal activities of antibiotics against intracellular Francisella tularensis. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Dec;44(12):3428-31. PubMed PMID: 11083651. Pubmed Central PMCID: 90216. Epub 2000/11/18. eng.

31. Piercy T, Steward J, Lever MS, Brooks TJ. In vivo efficacy of fluoroquinolones against systemic tularaemia infection in mice. J Antimicrob Chemother. 2005 Dec;56(6):1069-73. PubMed PMID: 16223941. Epub 2005/10/15. eng.
32. La Scola B, Elkarkouri K, Li W, Wahab T, Fournous G, Rolain JM, et al. Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the Francisella tularensis paradigm. Genome Res. 2008 May;18(5):742-50. PubMed PMID: 18407970. Pubmed Central PMCID: 2336804. Epub 2008/04/15. eng.
33. Hepburn MJ, Simpson AJ. Tularemia: current diagnosis and treatment options. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008 Apr;6(2):231-40. PubMed PMID: 18380605. Epub 2008/04/03. eng.
34. Ahmad S, Hunter L, Qin A, Mann BJ, van Hoek ML. Azithromycin effectiveness against intracellular infections of Francisella. BMC Microbiol. 2010;10:123. PubMed PMID: 20416090. Pubmed Central PMCID: PMC2881020. eng.
35. Johansson A, Berglund L, Gothefors L, Sjostedt A, Tarnvik A. Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children. Pediatr Infect Dis J. 2000 May;19(5):449-53. PubMed PMID: 10819342. Epub 2000/05/20. eng.
36. Zhanel GG, Walkty A, Vercaigne L, Karlowsky JA, Embil J, Gin AS, et al. The new fluoroquinolones: A critical review. Can J Infect Dis. 1999 May;10(3):207-38. PubMed PMID: 22346384. Pubmed Central PMCID: PMC3250697. eng.
37. Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. Infect Dis Clin North Am. 2009 Dec;23(4):791-815, vii. PubMed PMID: 19909885. eng.
38. Maurin M, Raoult D. Intracellular organisms. Int J Antimicrob Agents. 1997 Jun;9(1):61-70. PubMed PMID: 18611821. eng.
39. Morais Cabral JH, Jackson AP, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A, Liddington RC. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. Nature. 1997 Aug 28;388(6645):903-6. PubMed PMID: 9278055. Epub 1997/08/28. eng.
40. Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern WV, Pagès JM. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. J Antimicrob Chemother. 2007 Jun;59(6):1223-9. PubMed PMID: 17229832. eng.
41. Hernández A, Sánchez MB, Martínez JL. Quinolone resistance: much more than predicted. Front Microbiol. 2011;2:22. PubMed PMID: 21687414. Pubmed Central PMCID: PMC3109427. eng.
42. Bina XR, Lavine CL, Miller MA, Bina JE. The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of Francisella tularensis is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice. FEMS Microbiol Lett. 2008 Feb;279(2):226-33. PubMed PMID: 18179581. Epub 2008/01/09. eng.
43. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clin Microbiol Rev. 2009 Oct;22(4):664-89. PubMed PMID: 19822894. Pubmed Central PMCID: 2772364. Epub 2009/10/14. eng.
44. Garcia del Blanco N, Gutierrez Martin CB, de la Puente Redondo VA, Rodriguez Ferri EF. In vitro susceptibility of field isolates of Francisella tularensis subsp. holarctica recovered in Spain to several antimicrobial agents. Res Vet Sci. 2004 Jun;76(3):195-8. PubMed PMID: 15046952.
45. Ikaheimo I, Syrjala H, Karhukorpi J, Schildt R, Koskela M. In vitro antibiotic susceptibility of Francisella tularensis isolated from humans and animals. J Antimicrob Chemother. 2000 Aug;46(2):287-90. PubMed PMID: 10933655. Epub 2000/08/10. eng.
46. Johansson A, Urich SK, Chu MC, Sjostedt A, Tarnvik A. In vitro susceptibility to quinolones of Francisella tularensis subspecies tularensis. Scand J Infect Dis. 2002;34(5):327-30. PubMed PMID: 12069013.

47. Urich SK, Petersen JM. In vitro susceptibility of isolates of Francisella tularensis types A and B from North America. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Jun;52(6):2276-8. PubMed PMID: 18411318.
48. Chocarro A, Gonzalez A, Garcia I. Treatment of tularemia with ciprofloxacin. Clin Infect Dis. 2000 Aug;31(2):623. PubMed PMID: 10987739.
49. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth Informational Supplement.M100-S19. Vol.29 n°3. 2009.
50. LeBlanc JJ, Campbell S, Pettipas J, Hatchette TF, Davidson RJ. Herpes simplex virus type 2 displays atypical melting-temperature profiles at low viral titers. J Clin Microbiol. 2008 Aug;46(8):2786-9. PubMed PMID: 18524967.
51. Song J, Li PE, Gans J, Vuyisich M, Deshpande A, Wolinsky M, et al. Simultaneous pathogen detection and antibiotic resistance characterization using SNP-based multiplexed oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR). Adv Exp Med Biol. 2010;680:455-64. PubMed PMID: 20865530.
52. Fung-Tomc J, Kolek B, Bonner DP. Ciprofloxacin-induced, low-level resistance to structurally unrelated antibiotics in Pseudomonas aeruginosa and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 1993 Jun;37(6):1289-96. PubMed PMID: 8328778. Pubmed Central PMCID: PMC187955. eng.
53. Gillespie SH, Basu S, Dickens AL, O'Sullivan DM, McHugh TD. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on Mycobacterium fortuitum mutation rates. J Antimicrob Chemother. 2005 Aug;56(2):344-8. PubMed PMID: 15956099. Epub 2005/06/16. eng.
54. Eliasson H, Back E. Tularaemia in an emergent area in Sweden: an analysis of 234 cases in five years. Scand J Infect Dis. 2007;39(10):880-9. PubMed PMID: 17886125. Epub 2007/09/22. eng.
55. Yesilyurt M, Kilic S, Celebi B, Celik M, Gul S, Erdogan F, et al. Antimicrobial susceptibilities of Francisella tularensis subsp. holarctica strains isolated from humans in the Central Anatolia region of Turkey. J Antimicrob Chemother. 2011 Nov;66(11):2588-92. PubMed PMID: 21856791.
56. Russell P, Eley SM, Fulop MJ, Bell DL, Titball RW. The efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental tularaemia. J Antimicrob Chemother. 1998 Apr;41(4):461-5. PubMed PMID: 9598777. Epub 1998/05/23. eng.
57. Celebi G, Baruonu F, Ayoglu F, Cinar F, Karadenizli A, Ugur MB, et al. Tularemia, a reemerging disease in northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment responses. Jpn J Infect Dis. 2006 Aug;59(4):229-34. PubMed PMID: 16936340. Epub 2006/08/29. eng.
58. Johansson A, Berglund L, Sjostedt A, Tarnvik A. Ciprofloxacin for treatment of tularemia. Clin Infect Dis. 33. United States2001. p. 267-8.
59. Wagner C, Sauermann R, Joukhadar C. Principles of antibiotic penetration into abscess fluid. Pharmacology. 2006;78(1):1-10. PubMed PMID: 16864973.
60. Bryant RE, Mazza JA. Effect of the abscess environment on the antimicrobial activity of ciprofloxacin. Am J Med. 1989 Nov;87(5A):23S-7S. PubMed PMID: 2589367. eng.
61. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2010 Jul;34(4):415-25. PubMed PMID: 20059548.
62. Forsman M, Henningson EW, Larsson E, Johansson T, Sandstrom G. Francisella tularensis does not manifest virulence in viable but non-culturable state. FEMS Microbiol Ecol. 2000 Mar 1;31(3):217-24. PubMed PMID: 10719202. Epub 2000/03/17. Eng.



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Gautier HOARAU

« Recherche de mutants de *Francisella tularensis* résistants aux fluoroquinolones chez les patients atteints de tularémie. »

Résumé

En Europe, les fluoroquinolones sont le traitement de première intention de la tularémie. Cependant, 10 à 15% des patients traités rechutent, suggérant la possibilité d'une sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones. Le but de cette étude était de développer un outil moléculaire permettant la détection de la résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis*, afin de détecter la présence de mutants résistants aux fluoroquinolones chez des patients en échec clinique.

Nous avons mis au point une PCR en temps réel, permettant la détection de mutations au niveau du QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *gyrA*, codant pour la sous unité A de l'ADN gyrase, principale cible des fluoroquinolones chez *F. tularensis*. La sensibilité et la spécificité de ce test ont été validées en utilisant des souches de *F. tularensis* sensibles aux fluoroquinolones, et des souches atténuées résistantes aux fluoroquinolones préalablement sélectionnées au laboratoire.

La PCR en temps réel a permis de différencier les souches sensibles des souches résistantes, d'après l'analyse des températures de fusion. Après analyse de 57 échantillons cliniques de ganglions suppurés, nous n'avons pas identifié de mutation de *gyrA*.

Notre test peut donc être utilisé en pratique clinique pour détecter les mutations de *gyrA* chez *F. tularensis* sur des souches ou directement sur des prélèvements cliniques. Cependant nos travaux indiquent que la sélection *in vivo* de mutants résistants aux fluoroquinolones chez *F. tularensis*, après traitement, est vraisemblablement un phénomène très rare, et n'explique pas les rechutes fréquemment observées.

Mots clefs : *Francisella tularensis*, GyrA, tularémie, quinolone, résistance aux antibiotiques

Jury : Monsieur le Professeur Jean-Paul Stahl (président)
Monsieur le Professeur Max Maurin (directeur)
Monsieur le Professeur Patrice Morand
Monsieur le Docteur Jacques Croizé
Monsieur le Docteur Olivier Epaulard