

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**ECOLE DOCTORALE THEMATIQUE Biologie-Santé**

**Faculté de Médecine**

**EA3175, Equipe Avenir Inserm, Biologie Cellulaire et Moléculaire des Microorganismes**

**Thèse N° [ ]**

**Thèse**

**pour obtenir le grade de**

**Docteur de l'Université de Limoges**

Discipline : **Biologie-Sciences-Santé**

présentée et soutenue par

**Olivier BARRAUD**

le 16/12/2011

**Intégrons de résistance et pression de sélection antibiotique**

Thèse dirigée par le Professeur **Marie-Cécile Ploy**

Présentée devant le jury composé de :

Professeur **FRANÇOIS DENIS**

*Président*

Professeur **ANTOINE ANDREMONT**

*Rapporteur*

Docteur **THIERRY NAAS**

*Rapporteur*

Professeur **PATRICE COURVALIN**

*Examineur*

Professeur **MARIE-CECILE PLOY**

*Directrice de thèse*

*A la mémoire de Lucien Audouze*

## *Remerciements*

**A Monsieur le Professeur François DENIS**, Professeur émérite des Universités - Praticien hospitalier, Membre de l'Académie Nationale de Médecine, Ancien Chef du Pôle de Biologie-Hygiène du CHU de Limoges, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Votre dynamisme, votre simplicité, votre connaissance et votre passion pour la microbiologie sont des moteurs permanents de mon intérêt pour cette discipline. Travailler au sein du laboratoire de recherche que vous avez créé, tout comme au sein du laboratoire hospitalier que vous avez façonné, est un privilège. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

**A Monsieur le Professeur Antoine ANDREMONT**, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, et **Monsieur le Docteur Thierry NAAS**, Maître de conférence des Universités, Praticien hospitalier, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. C'est un honneur que de pouvoir vous présenter mes travaux. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

**A Monsieur le Professeur Patrice COURVALIN**, Chef de l'Unité des agents antibactériens (Institut Pasteur), de m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

**A Mademoiselle le Professeur Marie-Cécile PLOY**, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Chef de service du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU Limoges, Directrice de l'EA3175/Avenir Inserm, d'avoir été la directrice de cette thèse. Ta patience, ta pugnacité, ton écoute et tes conseils précieux m'auront été d'une grande aide durant toutes ces années. Travailler à tes côtés est un honneur et un réel plaisir. Merci de la confiance que tu m'as apportée, j'espère en être digne. Trouve en cette thèse l'expression de toute ma gratitude et de ma profonde sympathie.

**Je remercie l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.**

Mes premiers remerciements s'adressent aux membres de l'EA3175/ Avenir Inserm, prochainement labellisée UMR Inserm 1092 : les « intégronistes » Emilie G et Thomas avec qui l'aventure a démarré, Sandra, Sophie, Emilie S, Thibault et Chloé qui ont rejoint l'équipe plus récemment, mais aussi bien sûr les « CMVistes » Gaël, Sébastien C, Sébastien S, Lucie et Raphaël. Un grand merci aussi à Martine et Aurore pour leur précieuse aide technique.

Je remercie Mademoiselle Marie-Claire Baclet pour sa collaboration dans la mise au point de la technique de PCR en temps réel, et Monsieur le Docteur Didier Mazel, responsable de l'Unité de Plasticité du Génome Bactérien (Institut Pasteur), qui nous a gentiment fourni certaines bactéries et apporté ses conseils avisés dans la rédaction des articles.

Je tiens également à remercier toutes celles et ceux avec qui je travaille au sein du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU Limoges : mes collègues biologistes les Professeurs Sophie Alain et Sylvie Rogez, les Docteurs Fabien Garnier, Sébastien Hantz, Nadia Hidri, Christian Martin, Marcelle Mounier et Nathalie Pestourie-Penault, ainsi que l'ensemble du personnel avec une attention toute particulière à Delphine souvent sollicitée pour les protocoles de recherche clinique.

Enfin, je tiens à remercier vivement l'ensemble des membres du Centre d'Investigation Clinique (CIC) du CHU Limoges pour leur accueil, leur disponibilité et leur professionnalisme, avec un remerciement tout particulier pour le Dr Bruno François, Praticien hospitalier, Médecin coordonnateur du CIC qui m'a grandement aidé dans la rédaction des projets de recherche clinique.

**Mes derniers et plus sincères remerciements s'adressent à ma famille et à mes proches pour leur soutien permanent durant cette thèse et bien au-delà :** à Claire pour sa patience durant mes longues heures passées au laboratoire, à mes parents et ma grand-mère avec toute mon affection, à des amis de longue date Bernard E, Bernard L, Dominique, Jean-Marc, Marie-Thérèse, Monique et Yannick, à mes amis limougeauds et bordelais André, Anne, Audrey, Aurélie, Caroline, Charles, Christophe, Constantin, Coralie, David R, Elise, Elodie, Emilie, Estelle, Frédéric, Geoffrey, Guillaume, Hélène, Jean-Baptiste, Jean-Marie, Julien, Laure, Loïc, Marie, Marie-Laurence, Muriel, Myriam, Philippe, Sabine, Sandrine, Sébastien et tous les autres pour tous les bons moments passés ensemble, et enfin à mes Amis Arnaud, David B et Franck en qui mon amitié n'a d'égale que la confiance que je leur porte.

# Sommaire

<b>Préambule</b> .....	<b>10</b>
<b>Chapitre 1 : Revue bibliographique sur les intégrons de résistance</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>12</b>
<b>I. STRUCTURE ET MECANISTIQUE DES INTEGRONS</b> .....	<b>13</b>
A. STRUCTURE DES INTEGRONS .....	13
1. <i>La plateforme fonctionnelle</i> .....	13
2. <i>La région variable : les cassettes</i> .....	17
3. <i>La région 3'</i> .....	21
B. LES MOUVEMENTS DE CASSETTES.....	22
C. REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'INTEGRASE ET DES GENES DE CASSETTES.....	25
1. <i>Régulation de l'expression de l'intégrase</i> .....	25
2. <i>Régulation de l'expression des gènes de cassettes</i> .....	28
<b>II. EPIDEMIOLOGIE DES INTEGRONS DE RESISTANCE</b> .....	<b>30</b>
A. LES IR DE CLASSE 1, 2 ET 3 .....	31
1. <i>IR de classe 1 : les plus prévalents</i> .....	31
2. <i>IR de classe 2 : la stabilité</i> .....	31
3. <i>IR de classe 3 : la rareté</i> .....	32
4. <i>Intégrons complexes, intégrons chimériques</i> .....	33
B. LES BACTERIES HOTES .....	34
1. <i>Bactéries à Gram négatif (BGN)</i> .....	34
2. <i>Bactéries à Gram positif (BGP)</i> .....	35
C. ROLE DES IR DANS LA DISSEMINATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	36
1. <i>En microbiologie humaine</i> .....	36
2. <i>Dans le monde animal</i> .....	39
3. <i>Dans l'environnement</i> .....	41
<b>III. PRESSION DE SELECTION ANTIBIOTIQUE ET ROLE DES INTEGRONS SUR L'ACQUISITION DE RESISTANCES</b> .....	<b>44</b>
A. LA PRESSION DE SELECTION ANTIBIOTIQUE .....	44
B. PRESSION DE SELECTION ANTIBIOTIQUE ET INTEGRONS DE RESISTANCE .....	47
1. <i>Lien entre présence d'intégrons de résistance et multirésistance aux antibiotiques</i> . 47	
2. <i>Pression de sélection antibiotique et réarrangement de cassettes</i> .....	50
3. <i>Etudes cliniques, animales et environnementales sur le lien entre pression de sélection antibiotique et présence d'intégrons de résistance</i> .....	52
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>62</b>

**Chapitre 2 : Présentation du travail de thèse.....63**

*Axe fondamental.....66*

*Effet in vitro d'une pression de sélection antibiotique sur le réarrangement des cassettes au sein d'un intégron*

*Axe épidémiologique.....98*

*Effet in vivo de la pression de sélection exercée par les antibiotiques sur la prévalence des intégrons de résistance*

Partie 1 : Mise au point d'une PCR en temps réel multiplex pour la détection des intégrons de résistance de classe 1, 2 et 3.....99

Partie 2 : Caractérisation d'intégrons de résistance chez des isolats bactériens.....107

Partie 3 : Prévalence du portage digestif des intégrons de résistance chez l'homme.....137

Partie 4 : Protocole « Hemotion » : évaluation de la valeur prédictive du marqueur intégron recherché à partir de flacons d'hémoculture positifs à bacilles à Gram négatif.....160

**Chapitre 3 : Discussion générale.....184**

**Conclusion.....207**

**Références bibliographiques.....208**

**Annexe.....224**

## Résumé

Les intégrons sont des éléments génétiques bactériens de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Ils sont très répandus, majoritairement au sein des bactéries à Gram négatif (BGN). Les intégrons de résistance (IR) jouent un rôle majeur en bactériologie médicale en raison de leur capacité de recrutement et d'expression de gènes de résistance aux antibiotiques. L'objectif de ce travail de thèse était d'analyser les effets de la pression de sélection antibiotique sur les IR, d'un point de vue mécanistique sur les réarrangements de cassettes et d'un point de vue plus appliqué sur le portage digestif d'IR. Une première partie du travail à consister à réaliser des expériences de pression de sélection maîtrisée sur une souche d'*Escherichia coli* portant un IR synthétique avec 4 cassettes de résistance ; une seconde partie s'est attachée, grâce à la mise au point d'une technique de qPCR, à détecter les IR dans des environnements complexes soumis à des pressions de sélection antibiotique (tube digestif de patients hospitalisés, bactéries isolées d'effluent hospitalier ou de prélèvements cliniques) en se focalisant sur le lien entre IR et résistance aux antibiotiques afin d'évaluer la valeur prédictive des IR en tant que biomarqueurs. Pour la partie fondamentale, nos travaux ont montré, dans notre modèle, que l'intégrase était capable, sans être surexprimée, d'assurer des réarrangements de cassettes au sein d'un IR de façon à conférer à la bactérie une plus grande résistance à l'antibiotique qui exerçait la pression. Nos travaux appliqués ont permis de décrire de nouveaux IR au sein de bactéries et ont montré un effet de la pression de sélection antibiotique sur le portage digestif en IR. Le lien IR - résistance aux antibiotiques a été confirmé. Les IR semblent être un marqueur prometteur de la résistance aux antibiotiques chez les BGN, notamment en termes de valeur prédictive négative.

## *Abstract*

*Integrans are bacterial genetic elements able to capture and express genes embedded within cassettes. Integrans are widely distributed notably among Gram-negative bacteria (GNB). Resistant integrans (RI) are involved in medical bacteriology due to their ability in recruiting and expressing genes encoding resistance to antibiotics. Aim of this work was to better understand the effect of antibiotic selective pressure on RI working both on a mechanistic level concerning gene cassette rearrangements and on an epidemiological level concerning the link between antibiotic selective pressure and digestive carriage of RI. First part of the work concerned experimental assays of antibiotic selective pressure on an Escherichia coli strain harboring a RI with 4 gene cassettes; second part first consisted in the development of a qPCR method to detect RI, and secondly detected RI in complex environments submitted to antibiotic selective pressures (stools of inpatients, bacteria isolated from hospital effluent or from clinical origin) with focus on the link between RI and antibiotic resistance so as to evaluate the predictive value of RI as biomarkers. Concerning fundamental work, we demonstrated, in our model, that integrase was able, without overexpression, to catalyze gene cassettes rearrangements so as to confer to the host bacteria a higher resistance against the antibiotic selective pressure. Epidemiological work leads to describe new RI among bacteria and showed an effect of antibiotic selective pressure on RI carriage. The link between RI and resistance to antibiotics was confirmed. RI could constitute a hopeful marker of antibiotic resistance in GNB, particularly if considering its negative predictive value.*

## *Glossaire*

<b>5' CS</b>	région 5' conservée
<b>A</b>	adénine
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>BGN</b>	bactérie à Gram négatif
<b>BGP</b>	bactérie à Gram positif
<b>BLSE</b>	$\beta$ -lactamase à spectre élargi
<b>C3G</b>	céphalosporine de 3 <sup>ème</sup> génération
<b>CMI</b>	concentration minimale inhibitrice
<b>G</b>	guanine
<b>IR</b>	intégron de résistance
<b>kb</b>	kilobase
<b>M</b>	molaire (mole par litre)
<b>mg/L</b>	milligrammes par litre
<b>mL</b>	millilitre
<b>mM</b>	millimolaire
<b>ng</b>	nanogramme
<b>pb</b>	paire de bases
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>Pc</b>	promoteur des cassettes
<b>Pint</b>	promoteur de l'intégrase
<b>PM</b>	poids moléculaire
<b>qPCR</b>	PCR en temps réel ( <i>quantitative PCR</i> )
<b>STEP</b>	station d'épuration
<b>T</b>	thymine
<b><math>\mu</math>g</b>	microgramme
<b><math>\mu</math>L</b>	microlitre
<b><math>\mu</math>M</b>	micromolaire
<b>R</b>	purine
<b>Y</b>	pyrimidine

# Préambule

Depuis leur commercialisation, les antibiotiques auront été des médicaments miraculeux. Des maladies qui décimaient des populations entières, telles que la tuberculose ou la peste, ont pu être traitées et voir leur prévalence s'effondrer grâce aux antibiotiques dont le succès est lié non seulement à leur efficacité mais aussi à leur sureté d'emploi. Cette euphorie, longtemps entretenue par la découverte de nouvelles familles et molécules, a connu un coup d'arrêt vers la fin des années 90. L'absence de découverte de nouvelles classes thérapeutiques d'antibiotiques, conjuguée à un usage abusif notamment chez les enfants, a abouti à une augmentation globale des niveaux de résistances des bactéries aux antibiotiques et à des multirésistances. Ce phénomène est d'autant plus inquiétant aujourd'hui que des mécanismes émergents apparaissent, aussi bien en ville qu'à l'hôpital, confrontant parfois les cliniciens à des quasi-impasses thérapeutiques. Pouvoir endiguer ou du moins maîtriser la problématique de la multirésistance nécessite différentes approches : un meilleur usage des antibiotiques, un meilleur respect des mesures d'hygiène afin de limiter la diffusion de ces bactéries, et enfin une meilleure compréhension des mécanismes d'acquisition des résistances aux antibiotiques afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les intégrons de résistance (IR) sont des supports génétique capables de conférer à une bactérie plusieurs résistances à plusieurs antibiotiques. Ils se démarquent des autres supports par un caractère dynamique où se mêlent des phénomènes complexes de régulation et d'expression des gènes de résistance. L'objectif de ces travaux était de mieux comprendre le fonctionnement et la place des IR dans des environnements soumis à une pression de sélection antibiotique.

## **Chapitre 1 :**

# **Revue bibliographique sur les intégrons de résistance aux antibiotiques**

## *Introduction*

Les intégrons sont des éléments génétiques bactériens capables de promouvoir l'acquisition et l'expression de gènes [1]. La définition d'un intégron se limite à la présence d'une plateforme fonctionnelle, appelée aussi région 5'CS (5' « *conserved segment* ») dans certaines publications, composée de 3 éléments clés : un gène *intI* qui code une intégrase IntI, un site spécifique de recombinaison *attI*, et un promoteur Pc [2, 3]. Les gènes, dont l'expression est assurée par Pc sont localisés dans des cassettes intégrées en aval de la plateforme fonctionnelle [Figure 1]. Les cassettes sont des éléments génétiques mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison catalysé par l'intégrase IntI.

Au sein des intégrons, sont définis deux grands groupes, les super-intégrons (SI) et les intégrons de résistance aux antibiotiques (IR). Les SI contiennent jusqu'à 200 cassettes et sont localisés sur le chromosome de centaines d'espèces bactériennes (17 % des génomes bactériens séquencés) [4] isolées le plus souvent des écosystèmes marins ou telluriques (*Vibrio sp*, *Xanthomonas sp...*). La plupart des gènes hébergés dans ces cassettes codent des protéines de fonctions inconnues.

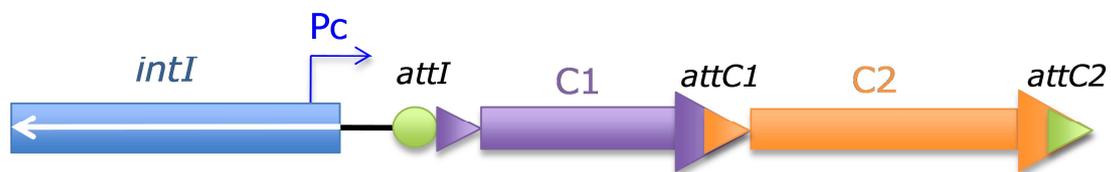
Les IR contiennent un nombre plus restreint de cassettes dans un même IR (à ce jour, au maximum 8 ([5], AF047479) à 9 (DQ112222)) dont les gènes codent le plus souvent des résistances aux antibiotiques. Les IR ne codent pas de fonction de transposition mais, localisés sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les transposons, ils peuvent être transférés entre bactéries et contribuent ainsi à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.

Dans le cadre de cette thèse, la revue bibliographique ne s'intéresse qu'aux IR. Une partie de ce travail a été publiée dans le Journal des Anti-infectieux (voir annexe).

# I. Structure et mécanistique des intégrons

## A. Structure des intégrons

L'élément qui définit un intégron est la plateforme fonctionnelle. Les cassettes localisées en aval de cette plateforme constituent la région dite variable [Figure 1].



**Figure 1: Structure usuelle d'un intégron.**

Un intégron est composé d'une plateforme fonctionnelle avec 3 éléments clés : un gène *intI* qui code une intégrase, un site spécifique de recombinaison *attI* et un promoteur Pc. Une région dite variable, localisée en aval de la plateforme fonctionnelle, renferme un réseau de cassettes. Pc: promoteur des cassettes ; C1, C2 : cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2* : sites spécifiques de recombinaison ; *intI*: gène de l'intégrase.

### 1. La plateforme fonctionnelle

#### a. L'intégrase *IntI*

L'intégrase *IntI* appartient à la famille des recombinases à tyrosine spécifiques de site [6]. Cette grande famille rassemble des protéines d'origine procaryote et eucaryote (levures) impliquées dans des processus communs de recombinaisons entre deux molécules d'ADN. L'intégrase du phage  $\lambda$  est la protéine référence de cette famille. L'alignement du site catalytique des différentes protéines a montré qu'elles possédaient toutes des motifs communs, et notamment une tétrade hautement conservée

R-H-R-Y (arginine, histidine, arginine, tyrosine) qui assure l'interaction avec la molécule d'ADN. La tyrosine fait partie du site catalytique de la protéine, elle est indispensable à la coupure de l'ADN.

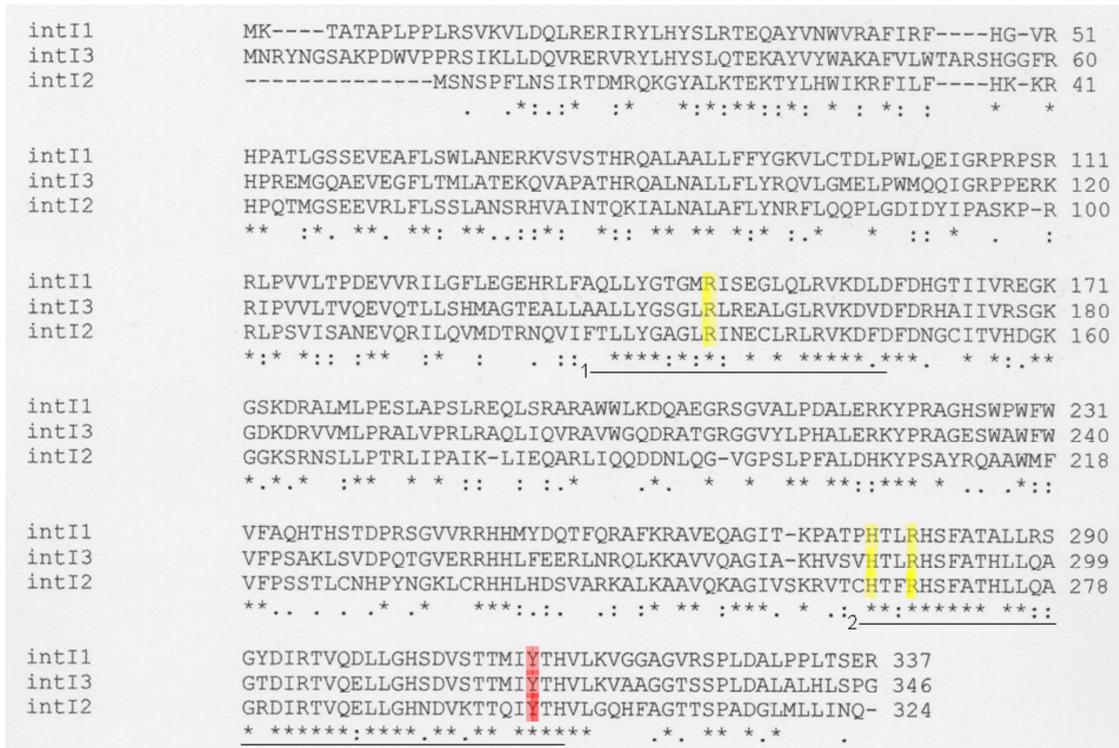
Cinq classes d'IR ont été définies en fonction de la séquence en acides aminés de leurs intégrases IntI [4] :

- les **IR de classe 1** sont caractérisés par l'intégrase **IntI1** qui comporte 337 acides aminés.
- les **IR de classe 2** sont caractérisés par l'intégrase **IntI2** qui comporte 325 acides aminés. Elle présente la particularité d'être interrompue par un codon stop (TAA) en position 179, ce qui la rend non fonctionnelle [7].
- les **IR de classe 3** sont caractérisés par l'intégrase **IntI3** qui comporte 346 acides aminés.
- les intégrons de classe 4 et 5 ont été identifiés *via* leur implication dans la résistance au triméthoprim. Ils ont été décrits chez des espèces du genre *Vibrio*, associés à des transposons conjugatifs. Leur implication en microbiologie clinique est considérée à ce jour comme nulle.

Il existe une très forte identité entre les séquences protéiques de ces 5 intégrases, notamment entre les intégrases 1, 2 et 3 [Figure 2]. Par exemple, IntI2 présente 46 % d'identité avec IntI1 ; IntI3 partage près de 60 % d'identité avec IntI1 [Tableau 1].

Intégrase	IntI1	IntI2	IntI3
IntI1	100	46,5	59,6
IntI2	63	100	46,3
IntI3	72,8	59,7	100

**Tableau 1 : Pourcentages d'identité (en bleu) et de similarité (en vert) entre les séquences en acides aminés des intégrases des classes 1, 2 et 3. D'après [8].**



**Figure 2 : Alignement des protéines IntI1, IntI2 et IntI3.**

Les 2 motifs les plus conservés au sein de ces 3 intégrases sont les domaines 1 et 2 qui hébergent la tétrade R-H-R-Y (arginine, histidine, arginine, tyrosine). La tyrosine est surlignée en rouge, les acides aminés RHR en jaune. L'alignement des séquences a été réalisé avec le logiciel ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>, juin 2007). Les étoiles indiquent les acides aminés communs entre les 3 intégrases.

Les IR de classe 1, 2 et 3 (IntI1, IntI2, IntI3) sont les plus étudiés et les plus prévalents, ceux de classe 4 et 5 n'ont été décrits qu'une seule fois.

### *b. Le site spécifique de recombinaison attI*

Il existe autant de sites *attI* que de gènes *intI* : le site *attI1* est toujours associé au gène *intI1*, le site *attI2* au gène *intI2* et le site *attI3* au gène *intI3*. Les différents sites *attI* des différents IR n'ont pas de réelle identité [9], excepté le triplet 5' GTT 3'. Contrairement aux gènes *intI*, l'alignement des sites *attI* [9] ne montre pas de réelle identité structurale, excepté une séquence de 7 paires de bases GTTRRRY (R : purine, Y : pyrimidine) appelé *core site* [Figure 3].

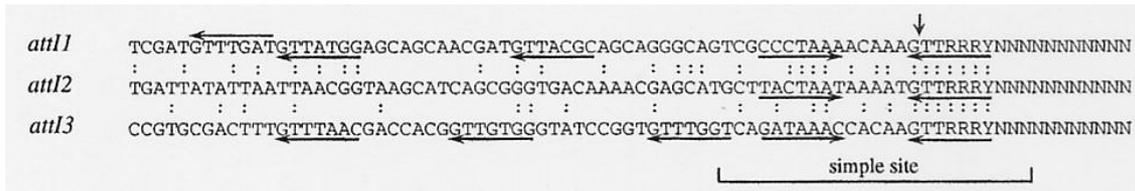


Figure 3 : **Alignement des séquences nucléotidiques des sites attI1, attI2 et attI3.**

Une région de 64 paires de bases, suffisante pour l'activité de recombinaison du site attI1, est alignée avec les séquences des sites attI2 et attI3. La flèche verticale indique la zone de jonction entre la région 5'CS et la première cassette. D'après [9].

Les sites attI comportent au moins 2 sites d'attachement de l'intégrase, nommés L et R. Concernant le site attI1, deux sites possédant le motif consensus GTTR assurent la liaison avec IntI1 : un site de forte liaison, critique pour l'activité de recombinaison et un site de faible liaison qui en améliore l'efficacité [10],[Figure 4].

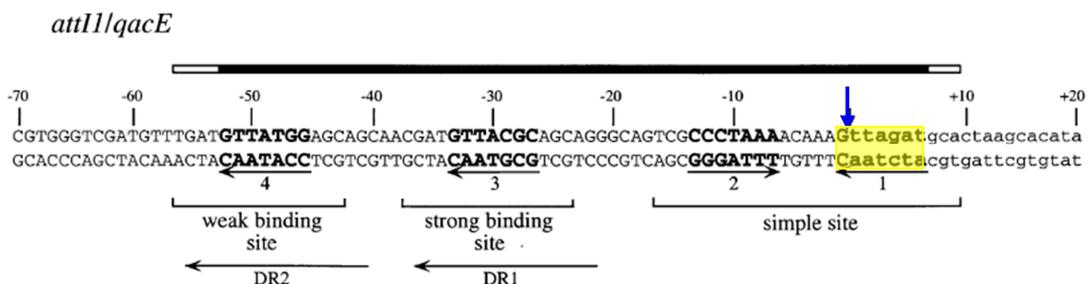


Figure 4 : **Organisation du site attI1. Exemple de la jonction attI1/qacE.**

La ligne noire définit le site attI1. Les rectangles blancs correspondent aux quelques bases supplémentaires impliquées dans la reconnaissance d'IntI1. Sont représentés les sites de liaison d'IntI1 à attI1 (weak binding site, strong binding site), ainsi que le site unique (simple site, motif formé de 2 séquences inversées répétées séparées par un espace de 6 nucléotides) impliqué dans les recombinaisons attI x attI. Les lettres en gras sont reliées à une séquence consensus de 7 paires de bases GTTRRRY appelé core site (surligné en jaune) ; DR1 et DR2 sont des séquences directes répétées (direct repeats). La flèche verticale bleue indique la zone de jonction entre la région 5'CS et la cassette qacE. D'après [10].

Il existe une forte spécificité des intégrases pour leur site attI mais des recombinaisons peuvent intervenir de façon moins efficace avec les sites attI d'autres IR. Par exemple, IntI1 reconnaît aussi les sites attI2 et attI3 [11].

### c. *Le promoteur des cassettes Pc*

Pc est le promoteur qui assure l'expression des gènes de cassettes, celles-ci ne possédant pas de promoteur propre à de rares exceptions près (cassettes *cml* et *qac* [12]). La région promotrice des IR de classe 1 a été la plus étudiée [13, 14]. Pc est situé dans la séquence codante d'IntI1, plus de 200 bases en amont de la première cassette. Chez 10 % des IR de classe 1, il existe un deuxième promoteur des cassettes P2 localisé dans le site *attI1*, environ 90 bases en aval de Pc. Le promoteur P2 est dû à une insertion de 3 G entre 2 boîtes -10 et -35 potentielles, permettant un espacement suffisant pour un promoteur efficace. Il existe différents variants de Pc dont les différentes forces induisent des niveaux d'expression et donc de résistance aux antibiotiques différents (voir « régulation de l'expression des gènes de cassettes »).

Chez les IR de classe 3, Pc est aussi localisé dans la séquence codante d'IntI3. Il existe au moins 2 variants, TAGACA-N<sub>17</sub>-TAGGCT [15] vs TAGACA-N<sub>17</sub>-TAGGAT [16] dont les forces relatives n'ont pas été évaluées.

Chez les IR de classe 2, la localisation de Pc diffère. En effet, il n'est pas localisé dans la séquence codante d'IntI2, mais au contraire dans le site *attI2* ; sa séquence a été récemment déterminée : TTTAAT-N<sub>16</sub>-TAAAAT [17].

## 2. La région variable : les cassettes

Les cassettes constituent la partie variable des intégrons, en aval de la plateforme fonctionnelle [Figure 1]. D'une taille moyenne de l'ordre de 1000 pb, une cassette est définie par l'association d'un cadre ouvert de lecture (*orf*) et d'un site spécifique de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase IntI. Les cassettes constituent des unités fonctionnelles indépendantes, non répliquatives, mobilisables de manière

individuelle [18] : elles existent sous forme linéaire au sein d'un intégron ou sous forme circulaire à l'état libre. Les IR hébergent en moyenne 2 à 3 cassettes [19]. Jusqu'à 9 ont été décrites au sein d'un même IR (DQ112222) , mais ce chiffre est parfois nul [20].

#### a. Les gènes de cassettes

La plupart des gènes de cassettes des IR codent une résistance aux antibiotiques ou aux antiseptiques ; d'autres *orf* codent des protéines de fonction inconnue. Une revue de 2009 recense au sein des IR **plus de 130 cassettes différentes codant des résistances à des antibiotiques** et plus de 60 cassettes *gcu* (*gene cassette of unknown function*) codant des protéines de fonction inconnue [19].

Quasiment tous les antibiotiques sont concernés :

- de nombreuses cassettes sont impliquées dans la résistance aux  **$\beta$ -lactamines** ; les gènes codent des  $\beta$ -lactamases de spectre plus ou moins large : pénicillinases (*bla<sub>P</sub>*), oxacillinases (*bla<sub>oxa</sub>*),  $\beta$ -lactamases à spectre élargi ou BLSE (*ges*, *veb...*), voire carbapénémases (*imp*, *vim...*).
- les cassettes *dfr* (*dfrA* et *dfrB*) confèrent une résistance au **triméthoprim**
- la résistance aux **aminosides** est très fréquente ; les enzymes codées sont essentiellement des acétyltransférases (*aacA*, *aacC*, *aac(6')-Ib*) et des nucléotidytransférases (*aadA*, *aadB*). Les cassettes *sat* codent des résistances à la streptothricine.
- la résistance au **chloramphénicol** est conférée par un mécanisme enzymatique *via* une acétyltransférase (*catB*) ou par un mécanisme d'efflux (*cmlA*, *cmlB*).
- la résistance à la **fosfomycine** est médiée par les gènes des cassettes *fos*.

- la résistance aux **macrolides** est médiée par les cassettes *ere* qui confèrent une résistance à l'érythromycine ; celle aux **lincosamides** est due aux cassettes *lin*.
- la résistance à la **rifampicine** est conférée par les cassettes *arr*.
- la résistance aux **quinolones** est due aux cassettes *qnrVC* et *acc(6')-Ib-cr*.
- les cassettes *qac* confèrent une résistance aux **ammoniums quaternaires**.

La nomenclature des cassettes reste complexe, une même cassette pouvant être désignée par 2, voire 3 appellations (*aacA4* = *aac(6')-Ib* ; *dfrA12* = *dhfrXII* = *dfr12* ; *oxa10* = *PSE-2* ; ...). De plus, des cassettes différentes peuvent avoir le même nom. Des banques de données recensent et annotent les différents variants de cassettes [21, 22].

La plupart des cassettes ont été décrites chez des IR de classe 1. Les IR de classe 2 hébergent souvent les trois mêmes cassettes : *dfrA1*, *sat* et *aadA1* [2] du fait de la non fonctionnalité de l'intégrase IntI2 qui rend impossible le mouvement de ces cassettes et l'acquisition de nouvelles. Quelques IR de classe 2 avec d'autres réseaux de cassettes ont été néanmoins décrits [23-25]. Les rares descriptions des IR de classe 3 ont montré que ceux-ci hébergent souvent des cassettes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ou de résistance aux aminosides [16, 26]. Certaines cassettes sont retrouvées dans plusieurs classes d'IR : par exemple, *aadA1* a été décrit chez les IR de classe 1 et 2, *aac(6')-Ib* chez les IR de classes 1 et 3. A noter que les cassettes *dfr* et *aad* sont les plus répandues.

#### *b. Le site de recombinaison attC*

Le site *attC* entre dans la définition même d'une cassette [27]. Il s'agit d'un site spécifique de recombinaison reconnu par l'intégrase IntI.

A chaque gène de cassette donné est associé un site *attC* qui lui est propre. Les sites *attC* ont une structure complexe : ils diffèrent en séquence et en longueur (57 à 141 pb) en fonction du gène auquel ils sont associés, mais ils possèdent une organisation palindromique comparable [Figure 5] : à leurs extrémités 5' et 3' se trouvent deux séquences inversées répétées de 7 paires de bases [28] désignées respectivement 2L-2R et 1L-1R qui encadrent une région centrale de séquence et de longueur variable (20 à 104 pb) [4, 19]. Les séquences 2L et 2R sont des palindromes imparfaits, 2L possédant 1 base supplémentaire (soit 8 pb). Les séquences palindromiques 1R et 1L possèdent systématiquement les 2 triplets GTT et AAC, elles sont aussi appelées site *core* (généralement GTTRRRY) et site *core* inverse (RYYAAC) [28].



Figure 5 : Organisation du site *attC*. Exemple de la jonction *aadB/qacE*.

Le rectangle noir définit le site *attC*. Les rectangles blancs correspondent aux quelques bases supplémentaires impliquées dans la reconnaissance d'IntI. Le *core site* est surligné en jaune, l'*inverse core site* en vert. Les séquences de liaison à IntI, reliées au *core site*, sont en gras (1L, 1R, 2L, 2R) ; leur orientation est indiquée par des flèches. L'astérisque indique une base supplémentaire en 2L par rapport à 2R. La flèche verticale bleue indique la zone de jonction entre les cassettes *aadB* et *qacE*. Elle correspond à la numérotation 0 de la séquence. LH : *left-hand*, RH : *right-hand*. D'après [10].

A chaque extrémité des sites *attC*, se trouvent deux domaines (LH et RH) de 25 paires de bases environ dénommées *simple site* [Figure 5]. Ils présentent des séquences inversées répétées imparfaites l'une de l'autre ; ce sont les sites de reconnaissance et de liaison de l'intégrase IntI. Cette organisation palindromique permet de générer une

structure secondaire tige-boucle essentielle pour la reconnaissance par l'intégrase, qui interagit avec le site *attC* sous forme simple-brin et plus spécifiquement le brin du bas (*bottom strand*) [29].

Des différences notables existent entre la liaison de l'intégrase avec les sites *attC* et *attI* [30]: la liaison à un site *attC* est beaucoup moins forte [9] et contrairement aux sites *attI* [7, 31], il n'existe pas de spécificité des sites *attC* pour telle ou telle intégrase, preuve en est la présence de mêmes cassettes au sein d'IR de classes différentes.

### **3. La région 3'**

La région en aval du réseau de cassettes diffère selon les classes d'intégrons. Celle-ci revêt un intérêt en terme de résistance uniquement pour les IR de classe 1. En effet, chez certains IR de classe 1, peut se trouver en aval des cassettes, une région comportant en général 3 gènes : *qacEΔI*, *sulI* et *orf5*. Le gène *qacEΔI* (348 pb) est un dérivé tronqué de *qacE*, qui code une pompe d'efflux et confère à la bactérie une résistance aux antiseptiques et désinfectants, notamment vis-à-vis des ammoniums quaternaires et agents intercalants [32]. Le gène *qacEΔI* est fusionné avec le gène *sulI* (840 pb) qui code une dihydroptéroate synthétase indispensable à la synthèse des folates qui confère une résistance aux sulfamides. Chez l'intégron In1 situé sur le plasmide R46, un promoteur permettant la transcription de *qacEΔI* et de *sulI* a été mis en évidence 20 paires de bases en amont du codon d'initiation de *qacEΔI* [33]. La séquence codante *orf5* (501 pb) code une protéine de fonction inconnue qui a une région promotrice propre. La région 3' des IR de classe 1 a été initialement dénommée région 3'CS à l'image de la région 5'CS. Néanmoins, bon nombre de publications font

aujourd'hui état d'IR de classe 1 dont la région 3'CS est absente ou incomplète, ce qui d'ailleurs prend en défaut bon nombre de PCR utilisées pour amplifier la région variable, voire même pour détecter un IR de classe 1 [34].

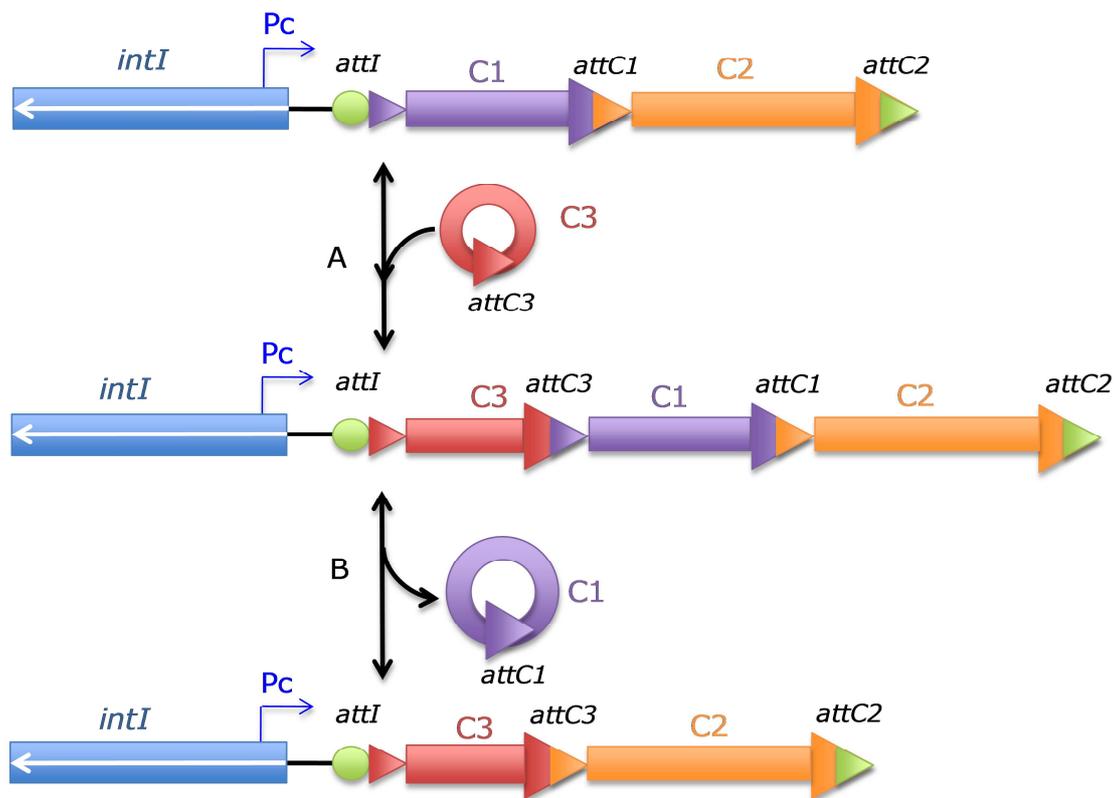
Chez les IR de classe 2, la région en aval du réseau de cassettes comporte des gènes *tns* impliqués dans des fonctions de transposition ; chez les IR de classe 3, elle est très peu décrite et donc mal connue.

## B. Les mouvements de cassettes

Les intégrases IntI sont capables de catalyser, *via* des recombinaisons spécifiques impliquant les sites *attI* et *attC*, des réarrangements de cassettes (excision ou intégration) au sein d'un IR ou entre deux IR [2, 7, 31], [Figure 6].

Les événements d'**excision** de cassettes se font préférentiellement par recombinaison entre deux sites *attC*. Les premiers travaux de Collis et Hall dans les années 1990 ont mis en évidence la capacité d'**excision** d'une ou de plusieurs cassettes par l'intégrase IntI1, suite à une recombinaison entre deux sites *attC* ou entre un site *attC* et le site *attI* [35]. Cette recombinaison peut s'opérer de deux façons différentes : soit *via* la formation et la résolution de cointégrats entre deux plasmides porteurs d'un intégron, soit *via* l'excision des cassettes sous forme circulaire [18].

L'**intégration** d'une cassette se fait préférentiellement par recombinaison entre les sites *attC* et *attI* [3, 36], permettant ainsi l'intégration de la cassette au plus près du promoteur Pc [37] et assurant ainsi une expression maximale du gène associé.



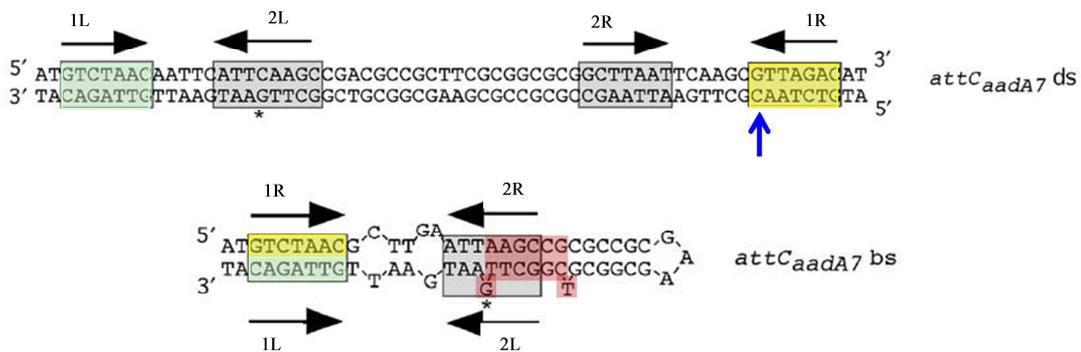
**Figure 6 : Mécanisme de recombinaison des cassettes.**

*IntI* assure l'insertion et l'excision des cassettes dans l'intégron. L'intégration d'une cassette se fait préférentiellement au site *attI*. Dans cet exemple (A), une cassette circulaire *C3* est intégrée sous forme linéaire par recombinaison spécifique de site entre le site *attI* et son site *attC3*. L'excision d'une cassette se fait préférentiellement par recombinaison entre 2 sites *attC*. Dans cet exemple (B), la cassette *C1* est excisée après recombinaison entre les sites *attC1* et *attC3*. *Pc*: promoteur des cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2*, *attC3* : sites spécifiques de recombinaison ; *intI*: gène de l'intégrase ; *C1*, *C2*, *C3* : cassettes.

L'événement de recombinaison a été finement caractérisé sur le plan moléculaire pour les IR de classe 1 [29, 38-40]. L'interaction d'une intégrase avec un site *attC* a été confirmée par cristallisation avec l'intégrase VChIntIA de *V. cholerae* [41]. Le motif indispensable à une recombinaison catalysée par *IntI* est le motif consensus GTTRRRY ; la recombinaison s'effectue entre le G d'un premier site GTT et le premier T d'un deuxième site GTT. L'événement de recombinaison a pour conséquence de toujours orienter la ou les cassettes intégrées dans le même sens, à savoir d'abord le gène, puis son site *attC* [27, 36], ce qui est indispensable à l'expression du gène.

L'intégrase reconnaît les sites *attI* sous leur forme double-brin et les sites *attC* sous leur forme simple-brin (brin *bottom*) [29, 42].

Les séquences palindromiques des sites *attC* permettent à la molécule d'ADN sous sa forme simple brin d'adopter une conformation repliée qui génère un site de recombinaison double brin [Figure 7] reconnu par l'intégrase [29].



**Figure 7 :** Séquence du site *attC* de la cassette *aadA7* (*attC<sub>aadA7</sub>* ds) et structure secondaire du brin *bottom* (*attC<sub>aadA7</sub>* bs).

Les séquences inversées répétées 1L, 1L, 1R, 2R sont indiquées par des flèches noires. L'astérisque indique la base G supplémentaire en 2L par rapport à 1L. Les séquences encadrées sont les sites de liaison de l'intégrase. Le *core site* est surligné en jaune, l'*inverse core site* en vert. La flèche verticale bleue indique le site de crossing-over. Les bases surlignées en rouge représentent le motif de 6 nucléotides encadrant 2 bases non appariées (T-N<sub>6</sub>-G) rencontré le plus fréquemment au sein des sites *attC* et pour lequel l'activité d'excision d'IntI1 est maximale. D'après [29, 43] avec modifications.

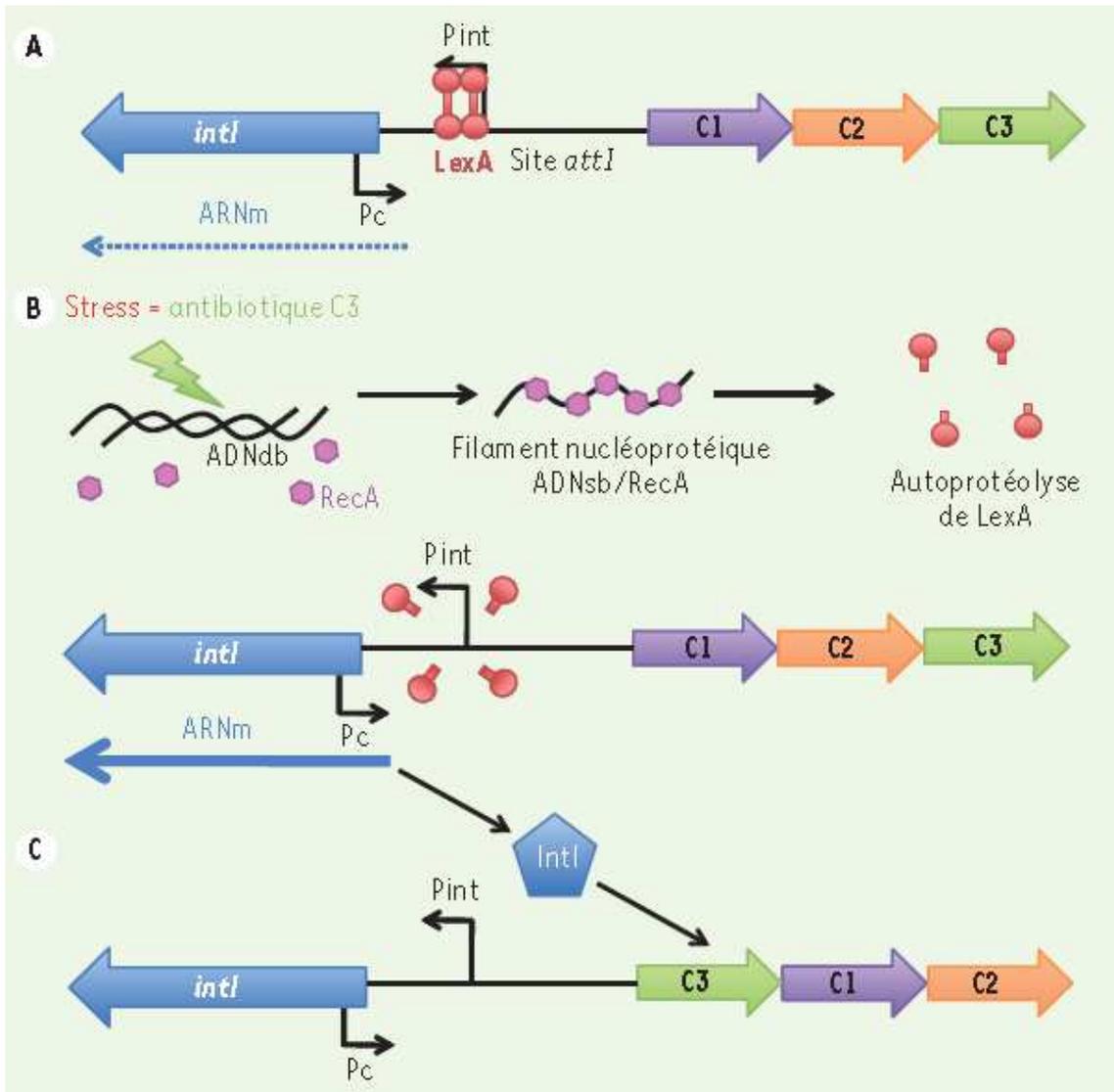
La reconnaissance des sites *attC* par les intégrases est fortement influencée par l'asymétrie de la structure secondaire générée par les bases « extra-hélice » non appariées du brin *bottom* [44]. La composition de ces bases et leur espacement, de généralement 6 nucléotides, influencent les capacités de recombinaison de la cassette. Ainsi, avec les motifs T-N<sub>6</sub>-G ou T-N<sub>6</sub>-C [Figure 7], IntI1 présente une meilleure efficacité d'excision, contrairement à IntI3 qui reconnaît un nombre plus restreint de motifs, et à IntI2 qui, elle, est plus « tolérante », capable notamment d'exciser des cassettes avec les motifs A-N<sub>7-8</sub>-C, ce qu'IntI1 peut difficilement faire [43].

## C. Régulation de l'expression de l'intégrase et des gènes de cassettes.

### 1. Régulation de l'expression de l'intégrase

Malgré les formidables capacités d'échanges de cassettes au sein du système intégron, certaines données montrent que ce système est en fait relativement stable. Preuves en sont la stabilité des réseaux de cassettes au sein de bactéries d'origine diverse [19, 45] et la persistance au sein de ces réseaux de gènes codant des résistances à des antibiotiques peu ou non usités aujourd'hui (*aad*, *sat*). La découverte récente d'un site de fixation de la protéine LexA au niveau de la région promotrice de l'intégrase Pint a permis de comprendre que l'expression d'IntI est régulée par la réponse SOS [46]. Ceci a été démontré expérimentalement pour IntI1 et pour l'intégrase du super-intégron de *V. cholerae*. Une analyse *in silico* a montré que LexA contrôlait l'expression du promoteur de plus de 600 intégrases différentes, suggérant que l'ancêtre commun des intégrases était déjà régulé par LexA [47].

La protéine LexA est le répresseur transcriptionnel de la réponse SOS bactérienne qui est impliquée dans la réparation des dommages que l'ADN subit lors de différents stress [48]. LexA réprime les gènes du régulon SOS en se fixant sur un site spécifique (boîte LexA) dans la région promotrice de ces gènes. Lors d'un stress, différentes voies conduisent à la formation d'ADN simple brin reconnu par la protéine RecA. Le filament nucléoprotéique ainsi formé est lui-même recruté par LexA et ce complexe active alors la capacité autoprotéolytique de LexA, entraînant son clivage et la libération de son site de fixation [Figure 8], permettant ainsi l'expression des gènes du régulon SOS.



**Figure 8 : Régulation de l'expression d'IntI par LexA.**

**A.** La protéine LexA chevauche le promoteur de l'intégrase Pint. **B.** Lors d'un stress conduisant à la formation d'ADN simple brin, par exemple par un antibiotique dont la résistance est codée par la 3<sup>e</sup> cassette, le filament nucléoprotéique ADNsb/RecA conduit à l'autoprotéolyse de LexA et donc à l'activation de la réponse SOS. Le promoteur de l'intégrase est alors libéré. **C.** L'intégrase alors produite effectue un réarrangement des cassettes, ramenant la 3<sup>e</sup> cassette en première position, pour permettre à la bactérie de résister au stress antibiotique qu'elle subit. Pc: promoteur des cassettes ; attI, attC1, attC2, attC3 : sites spécifiques de recombinaison ; intI: gène de l'intégrase ; Pint, promoteur de l'intégrase ; C1, C2, C3 : cassettes. D'après [49].

Ainsi, il a été montré chez *E. coli* qu'en réponse à des agents chimiques ou des antibiotiques inducteurs de la réponse SOS (ciprofloxacine, triméthoprime et ampicilline), il y avait une induction de l'expression de l'intégrase de classe 1 d'un

facteur 4. De plus, l'induction de la synthèse de l'intégrase est corrélée à une augmentation de 140 fois de son activité recombinase. La régulation de l'expression d'IntI par la réponse SOS offre plusieurs avantages à la bactérie : d'une part une économie énergétique, IntI n'étant produite que lorsqu'elle est nécessaire à la bactérie pour s'adapter à un stress, et d'autre part une stabilité des cassettes présentes dans l'intégron. Ce système permet à la bactérie de « conserver » plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques dont certains loin de Pc et donc silencieux car peu ou pas exprimés, mais qui, en cas de besoin, pourront être, après activation de l'intégrase, rapprochés de Pc permettant alors un niveau d'expression supérieur. Cette régulation démontre que les antibiotiques eux-mêmes sont capables d'induire *via* la réponse SOS la capture de gènes de résistance. De nombreuses cassettes codant des résistances à des antibiotiques inducteurs (triméthoprim,  $\beta$ -lactamines, quinolones) sont présentes chez les IR, montrant le rôle de la réponse SOS dans l'acquisition de gènes de résistance nécessaires à la bactérie pour survivre dans des conditions de stress. Une étude récente a montré que la réponse SOS était aussi induite lors de la conjugaison bactérienne qui génère des fragments d'ADN simple brin [50]. Les auteurs ont montré que la réponse SOS induite par la conjugaison était capable de déclencher l'expression de l'intégrase. La conjugaison est un phénomène utilisé par les bactéries pour des transferts horizontaux de gènes et est notamment impliquée dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques.

## 2. Régulation de l'expression des gènes de cassettes

Les gènes de cassettes, généralement dépourvus de promoteur, sont exprimés comme dans un opéron sous la dépendance du promoteur Pc. Chez les IR de classe 1, il existe pas moins de 20 combinaisons possibles Pc-P2 permettant l'expression des gènes de cassettes. Cinq combinaisons sont les plus fréquemment représentées (PcS, PcH1, PcW, PcW+P2 et PcW<sub>TGN-10</sub>) et correspondent à 5 niveaux de transcription variant de 1 à 25, PcS étant le variant le plus fort et PcW le variant le plus faible [Tableau 2] [14, 51]. De plus, en raison de la proximité des 3 promoteurs Pc, P2 et Pint, il a été montré que des interférences transcriptionnelles existent et varient selon la force du promoteur et sa séquence [52]. Le promoteur fort PcS empêche l'expression d'IntI1 même lorsque celle-ci est induite par la réponse SOS alors que les promoteurs faibles n'ont pas d'influence sur l'expression de l'intégrase. En revanche, l'expression de l'intégrase, lorsqu'elle est induite par la réponse SOS, n'a aucune incidence sur l'activité des promoteurs, quel que soit le variant, ceci ayant été étudié pour les variants les plus fréquents [52].

Par ailleurs, en raison de la localisation de Pc dans le gène *intI1*, la séquence de Pc influe sur la séquence en acides aminés de l'intégrase IntI1. Selon le variant de Pc, il existe différents variants d'IntI1 dont les activités de recombinaison des cassettes varient [Tableau 2]. Il existe une relation inverse entre la force de Pc et l'activité de recombinaison de l'intégrase IntI1 associée : plus le promoteur Pc est faible, plus l'activité de recombinaison de l'intégrase est forte. Cette « balance » entre force d'expression des cassettes et force de recombinaison d'IntI1 a été notamment démontrée en ce qui concerne l'activité d'excision de l'intégrase [14] ; d'autres auteurs, dans un modèle différent, ont retrouvé un effet sur l'activité d'intégration [53].

Variant de Pc	Séquence nucléotidique	Fréquence	Force relative de Pc	Variant d'IntI1	Activité d'excision d'IntI1
<b>PcS</b>	<b>TTGACA</b> – N <sub>14</sub> – TCNTAAACT	24,3 %	25	IntI1R32_N39	++
<b>PcH1</b>	<b>TGGACA</b> – N <sub>14</sub> – TCNTAAACT	28 %	6	IntI1R32_H39	+++++
<b>PcW</b>	<b>TGGACA</b> – N <sub>14</sub> – TCNTAAGCT	16,5 %	1	IntI1R32_H39	+++++
<b>PcW<sub>TGN-10</sub></b>	<b>TGGACA</b> – N <sub>14</sub> – <u>TG</u> N <sub>T</sub> AAGCT	16,8 %	18	IntI1P32_H39	+
<b>PcH2</b>	<b>TTGACA</b> – N <sub>14</sub> – TCNTAAGCT	4,4 %	20	IntI1R32_N39	++

**Tableau 2 : Principaux variants des promoteurs Pc des IR de classe 1.**

Les boîtes -35 et -10 du promoteur Pc sont indiquées en gras. La base G du motif TGN-10 est soulignée dans la séquence nucléotidique du PcW<sub>TGN-10</sub>. Les valeurs de fréquence émanent d'une analyse *in silico*. La force des variants de Pc est rapportée à celle du promoteur Pc le plus faible (PcW = 1). D'après [14].

Par ailleurs, le rôle potentiel des sites *attC* comme terminateurs de transcription avait initialement été suggéré [54] mais ceci a été remis en cause récemment. Les sites *attC* agiraient en fait sur le versant traductionnel *via* la présence au sein de certains sites *attC* de peptides qui joueraient un rôle de régulateur traductionnel [55]. Enfin, en ce qui concerne la traduction, certaines cassettes sont dénuées de régions d'initiation de la traduction (TIR). Dans le cas où ces cassettes sont en première position, il a été montré chez les IR de classe 1 que l'expression des gènes de cassettes était couplée à la traduction d'un petit peptide ORF11 lui-même précédé d'une région TIR [56]. La séquence *orf11* est localisée dans le site *attI1* mais le codon stop est dans la première cassette. Cette régulation n'a donc lieu que dans le cas où la séquence de la première cassette apporte le codon stop nécessaire à la production du peptide ORF11.

L'expression des gènes de cassette peut donc être extrêmement variable en fonction de trois paramètres principaux: (i) la force du variant Pc, (ii) la position de la cassette au sein de l'intégron [54] - les gènes les plus éloignés de Pc sont plus faiblement exprimés que ceux situés à proximité, (iii) la nature du site *attC* et donc de la cassette située en amont [55].

## *II. Epidémiologie des intégrons de résistance*

Des centaines de publications font état de la présence d'IR dans le monde vivant, aussi bien chez l'homme (sujets sains et malades) que chez l'animal (animaux de ferme, sauvages, domestiques...) ou dans l'environnement (sols, lacs, rivières, fumier, eaux usées...).

La prévalence des IR dans ces différents écosystèmes est impossible à déterminer et les études sont difficiles à comparer en raison de la trop grande diversité d'approches méthodologiques employées :

(i) les populations ciblées ne sont pas les mêmes : hommes sains, hommes malades, avec ou sans traitement antibiotique, aux modes de vie différents...,

(ii) les échantillons analysés diffèrent : selles, liquides biologiques, fumier, lisier, sols, rivières, boues de stations d'épuration...,

(iii) le support génétique analysé n'est jamais le même : certains auteurs travaillent à partir de souches bactériennes, de façon empirique ou en se focalisant sur des souches résistantes aux antibiotiques ou encore sur une espèce bactérienne donnée, d'autres travaillent de façon plus globale directement à partir d'un extrait d'ADN d'un échantillon donné dans le but de pouvoir apporter une réponse quantitative,

(iv) les classes d'IR recherchées ne sont pas toujours les mêmes : la classe 1 est la plus fréquemment recherchée et donc la plus retrouvée,

(v) les méthodes et techniques de détection employées diffèrent : PCR ciblant les intégrases, PCR de la région variable, PCR recherchant les cassettes, PCR en point final, PCR en temps réel, hybridation,...

Quoi qu'il en soit, les IR sont retrouvés chez pratiquement tous les êtres vivants et écosystèmes explorés, avec des taux de prévalence qui pour les raisons invoquées ci-dessus peuvent varier selon les études de quasiment 0 % à près de 100 %.

## **A. Les IR de classe 1, 2 et 3**

### **1. IR de classe 1 : les plus prévalents**

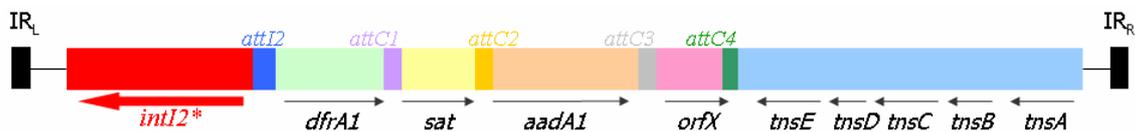
La très large majorité des publications s'intéresse à la description des IR de classe 1. Ils ont été les premiers découverts, sont les plus recherchés et restent les plus décrits dans la littérature à ce jour. Même s'il est légitime de constater que les IR de classe 1 sont les plus prévalents, il faut néanmoins garder à l'esprit qu'ils sont recherchés en priorité et qu'il existe donc des biais de détection des deux autres classes car la majorité des travaux sont menés sur des bactéries multirésistantes. Or, la très grande variabilité en cassettes des IR de classe 1 [19] leur permet de conférer des résistances bien plus diverses et nombreuses que celles conférées par les cassettes plus stables et moins variées des autres classes d'IR. Ainsi, la bactérie hôte peut résister à plusieurs familles d'antibiotiques simultanément.

### **2. IR de classe 2 : la stabilité**

Les IR de classe 2 présentent une grande stabilité dans leur réseau de cassettes avec la présence quasi-constante de 4 cassettes [Figure 9] : *dfrA1* (résistance au triméthoprim), *sat2* (streptothricine), *aadA1* (streptomycine et spectinomycine) et *orfX* [7]. Cette stabilité du réseau, confirmée par une étude argentine portant sur 130 souches

*intI2+* [25], est vraisemblablement attribuable à la non fonctionnalité d'IntI2 interrompue par un codon stop intermédiaire. L'association de ces IR au transposon Tn7 et à ses dérivés leur confère néanmoins une mobilité importante [57, 58]. Quelques publications font état de réseaux atypiques, avec par exemple une cassette *ereA* [24], les cassettes *aadB*, *catB2* [23] ou encore *bla<sub>CARB-4</sub>* [25].

L'épidémiologie des IR de classe 2 a été chamboulée en 2006 suite à la description chez deux souches bovines de *Providencia stuartii* d'un IR de classe 2 avec une intégrase dénuée de codon stop intermédiaire [59] qui retrouve sa fonctionnalité [7], et un réseau de 9 cassettes hébergeant chacune des gènes de fonction inconnue. Une souche d'*E. coli* isolée d'une urine d'un patient a depuis été décrite avec une protéine IntI2 fonctionnelle et la cassette *dfrA14* [60]. La prévalence de ces IR de classe 2 fonctionnels semble bien plus élevée qu'attendu, notamment dans l'environnement [61].



**Figure 9 :** Représentation schématique d'un IR de classe 2.

L'intégrase *intI2* est non fonctionnelle (\*) car interrompue par un codon stop en position 179. Le plus souvent, sont associées les cassettes *dfrA1* (résistance au triméthoprim), *sat* (résistance à la streptothricine) et *aadA1* (résistance à la streptomycine et spectinomycine). La séquence *orfX* code un gène de fonction inconnue. Côté 3', 5 gènes *tns* orientés en sens inverse assurent la fonction de transposition de Tn7. IR<sub>L</sub> et IR<sub>R</sub> désignent les séquences inversées répétées qui délimitent le transposon Tn7.

### 3. IR de classe 3 : la rareté

Moins d'une dizaine de publications fait état de leur description. Tous les IR de classe 3 décrits jusqu'alors associent une cassette de résistance aux  $\beta$ -lactamines à une

cassette *aac(6')-Ib* (résistance à kanamycine, tobramycine, nétilmicine et amikacine). La première découverte remonte à 1995 au Japon [15] chez une souche de *Serratia marcescens* résistante aux carbapénèmes (*bla<sub>IMP-1</sub>*). A ensuite été décrite au Portugal en 2003 une souche de *Klebsiella pneumoniae* avec un phénotype de BLSE (*bla<sub>GES</sub>*) [16] ; le même réseau a été retrouvé en Suisse chez une souche d'*E. coli* d'origine urinaire [62]. D'autres IR ont été identifiés chez des souches de *Pseudomonas putida* [63], sans caractérisation du réseau de cassettes. L'épidémiologie des IR de classe 3 a évolué depuis la découverte en 2007 de 2 souches environnementales du genre *Delftia*, (*D. acidovorans* et *D. tsuruatensis*), isolées d'eaux usées, qui possédaient un intégron de classe 3 atypique [64] avec des cassettes dont les gènes codaient des fonctions inconnues. La détection en quantité importante d'IR de classe 3 à partir d'ADN extraits d'environnements hydriques [65, 66] laisse suggérer qu'ils jouent un rôle bien plus important au niveau environnemental qu'en microbiologie clinique où leur impact semble anecdotique.

#### 4. Intégrons complexes, intégrons chimériques

Certains IR de classe 1 ont été nommés intégrons complexes en raison d'une structure particulière [67]. Ils ont la particularité de présenter une duplication parfois partielle de la région « 3' conservée » associée à la présence d'un élément transposable nommé *ISCR1* [68]. De nombreux gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques ont été décrits en aval de cette *ISCR1* [69-72] : *catA2* (résistance au chloramphénicol), *bla<sub>DHA-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-9</sub>* ( $\beta$ -lactamines), *dfrA10*, *dfrA19* (triméthoprime), *qnrA*, *qnrB* (quinolones)... Ces gènes ne sont pas inclus dans des cassettes car non associés à un site *attC* ; ils ne sont donc pas mobilisables par une intégrase IntI.

Il existe des IR chimériques ou hybrides qui possèdent des éléments associés à plusieurs classes d'IR. A ainsi été décrit un IR de classe 2 avec la région 3' des IR de classe 1 [73]. A également été décrit au sein d'IR de classe 1 la présence du réseau de 3 cassettes *dfrA1*, *sat1*, *aadA1* plutôt associé aux IR de classe 2 [74]. Une publication récente [75] rapporte chez un IR de classe 1 la description de la cassette *orfB* décrite jusqu'alors chez des IR de classe 3 [64]. Ces données suggèrent que des échanges de cassettes surviennent *in vivo* entre IR de classes différentes.

## **B. Les bactéries hôtes**

### **1. Bactéries à Gram négatif (BGN)**

La quasi-totalité des IR décrits sont hébergés par des BGN. Quasiment toutes les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* sont concernées, notamment *Escherichia coli* qui est le principal représentant [5, 60, 62, 76-79], *Klebsiella* [16, 80, 81], *Enterobacter* [12, 82-84] ou encore *Serratia* [15, 85, 86]. De nombreux travaux indiquent la présence d'IR chez *Salmonella* [87-91] et *Shigella* [45, 92, 93], *S. sonnei* étant un hôte fréquent des IR de classe 2 [94-96]. Les descriptions au sein d'autres genres (*Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Yersinia*...) sont plus rares [74, 97-99]. Chez les autres BGN non fermentaires, *Pseudomonas aeruginosa* est un hôte fréquent [20, 100-103] avec des cassettes codant souvent des résistances vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (BLSE, carbapénémases), tout comme *Acinetobacter baumannii* qui est également un hôte habituel [23, 73, 104, 105]. Les descriptions d'IR concernant d'autres BGN sont plus rares, voire exceptionnelles : *Stenotrophomonas* [106, 107], *Burkholderia* [108],

*Vibrio* [109-112], *Aeromonas* [113-115], *Campylobacter* [116, 117], *Helicobacter* [118], *Bordetella* [119, 120]...

## 2. Bactéries à Gram positif (BGP)

Seule une dizaine de publications fait état de la description d'IR, de classe 1 principalement, chez des bactéries à Gram positif. Le plus souvent, il s'agit de BGP à haut GC%, tels *Mycobacterium fortuitum* [121], des espèces du genre *Corynebacterium* (*C. glutamicum* [122, 123], *C. asperum* AJ871915, *C. resistens* FN825254, *C. diphtheriae* FR822749), ou encore les bactéries *Arcanobacterium pyogenes* [124, 125] et *Arthrobacter* [126]. Les IR semblent être présents parmi les BGP à une prévalence plus importante qu'il n'y paraît, des travaux s'intéressant à la litière de volailles ont ainsi montré que les BGP constitueraient un réservoir majeur d'IR [127]. L'une des premières descriptions d'un IR de classe 1 chez une bactérie d'intérêt médical remonte à 1999 avec la mise en évidence par une équipe américaine d'une cassette *aadA1* chez un isolat d'*Enterococcus faecalis* [128]. Plusieurs travaux chinois publiés depuis 2006 par une même équipe décrivent des IR de classe 1 chez des BGP d'importance majeure en bactériologie médicale : *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* [129] avec souvent les mêmes réseaux de cassettes *dfrA12-orfF-aadA2* ou *aadA2*. Plusieurs souches de staphylocoques à coagulase négative ont été recensées [130] ainsi que des souches de *S. aureus* (SASM et SARM) [131-133]. Les mêmes auteurs ont décrit aussi des IR de classe 2 chez des souches d'entérocoques (*E. faecalis*, *E. faecium*) [134].

## **C. Rôle des IR dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques**

### **1. En microbiologie humaine**

Des centaines de publications décrivent la présence d'IR chez l'homme. Les IR ont été mis en évidence chez de très nombreuses BGN à partir de tout type de prélèvements, et chez tout type de sujets, patients sains ou hospitalisés. Le nombre très important de descriptions est en partie lié au fait que bon nombre d'auteurs se sont intéressés aux IR par le biais des bactéries résistantes aux antibiotiques. Il est très difficile voire impossible d'évaluer la prévalence des IR en microbiologie clinique, les différentes études épidémiologiques menées n'étudiant pas les mêmes facteurs : cette prévalence dépend de trop nombreux paramètres liés à la bactérie elle-même, à son phénotype de résistance aux antibiotiques, au patient, au site d'isolement, ou encore au lieu d'hospitalisation, ou encore à la façon dont la détection des IR a été réalisée... Il est cependant acquis que les IR de classe 1 sont beaucoup plus répandus que les IR de classe 2, ceux de classe 3 étant exceptionnels.

Les données les plus abondantes concernent les IR retrouvés chez des BGN entéropathogènes. Plus de 200 publications décrivent des IR chez des salmonelles, shigelles et *E. coli* isolées de selles. Concernant les salmonelles, les études de prévalence restent néanmoins rares car les auteurs se focalisent le plus souvent sur un sérotype donné, une résistance ou un phénotype de résistance donné ou encore un clone donné. Une étude publiée en 2009 qui s'est intéressée à plus de 800 souches de salmonelles collectées durant 2 ans à Hong Kong a retrouvé une prévalence de 13 % d'IR de classe 1 [135]. Une autre étude menée en Iran portant sur près de 150 souches

rapporte une prévalence plus importante (47 %) avec description d'IR de classes 1 et 2, mais les salmonelles présentaient des niveaux de multirésistance aux antibiotiques plus importants [136]. Les shigelles sont des hôtes fréquents des IR, notamment des IR de classe 2 pour lesquels les prévalences sont particulièrement importantes. Une étude s'intéressant uniquement aux IR de classe 1 a ainsi retrouvé une prévalence de seulement 13 % [137] alors que des données coréennes [138] et sénégalaises [94] portant sur un nombre significatif d'isolats de *S. sonnei* ont au contraire retrouvé des prévalences très élevées en IR de classe 2 de respectivement 100 % et 93 %.

Concernant les prévalences d'IR détectés à partir des bactéries isolées d'hémocultures, celles-ci semblent en augmentation depuis quelques années. Un taux de 10,9 % a par exemple été rapporté par une étude norvégienne en 2004 à partir de 192 entérobactéries, quel que soit leur phénotype de résistance [139]. Une étude longitudinale allemande basée sur 700 entérobactéries isolées d'hémocultures a montré une augmentation significative de la prévalence d'IR au cours du temps passant de 4,7% en 1993 à 9,7 % en 1996 pour atteindre 17,4 % en 1999 [140]. Une étude espagnole plus récente menée en 2007 a trouvé une prévalence de 40 % sur 135 souches d'*E. coli* isolées [141]. Les études s'intéressant aux infections urinaires retrouvent des prévalences élevées, régulièrement supérieures à 40 %. Une étude australienne rapporte ainsi une prévalence d'IR de 49 % à partir de souches tout venant, sélectionnées sans tenir compte de leurs résistances [142]. Une autre étude coréenne comparable qui s'est intéressée à l'espèce *E. coli* révèle une prévalence stable entre 1980 et 2002, aux alentours de 54 % pour les IR de classe 1 et de 5 % pour ceux de classe 2 [143].

Quelques études se sont intéressées au portage en IR dans la communauté en analysant les bactéries commensales du tube digestif chez des sujets sains. Même s'il existe quelques variations liées à la sélection des sujets, à leur âge ou à leur mode de vie, ainsi qu'aux bactéries analysées, les différentes études retrouvent des prévalences en IR à peu près comparables, de l'ordre de 15-30 %. Une des premières études menée en 2002 aux Pays-Bas a évalué ce portage à 19 % en recherchant les IR à partir d'entérobactéries [144]. Une autre étude grecque s'intéressant uniquement aux *E. coli* a retrouvé un portage en IR de 11,1 % [145]. Enfin, une étude espagnole plus récente menée en 2007 qui a aussi travaillé sur des souches d'*E. coli* retrouve un portage en IR un peu plus élevé de 29 % [146]. Plusieurs paramètres semblent influencer le portage digestif en IR, notamment l'âge et le mode de vie. Une étude norvégienne a ainsi montré que les taux de portage en IR de classe 1 des *E. coli* différaient selon l'âge des sujets : 53 % chez des enfants *versus* seulement 17 % chez des sujets âgés [147]. Des travaux français ont montré que la prévalence variait selon le mode de vie des sujets : les taux d'IR retrouvés à partir d'*E. coli* commensaux était de 6,4 % chez des Amérindiens de Guyane Française *versus* 12,2 % chez des cadres français du secteur bancaire et des assurances *versus* 18,5 % chez des éleveurs de porcs [79]. La même équipe a montré, en prenant le cas de sujets expatriés en zone tropicale, que ce taux n'était pas statique et évoluait selon les conditions environnementales [148]. L'hospitalisation et l'antibiothérapie sont deux autres paramètres qui influencent le portage digestif en IR mais aussi d'une façon plus générale la prévalence en IR des bactéries pathogènes ; ces paramètres sont discutés dans le chapitre « Pression de sélection antibiotique ».

## 2. Dans le monde animal

Les IR ont été mis en évidence chez des bactéries commensales ou pathogènes chez pratiquement tous les animaux qu'il s'agisse d'animaux domestiques ou sauvages : chiens, chats, chevaux, bovins, ovins, porcins, volailles, animaux de zoo, tortues, mouettes, rennes... [149-154]. Les piscicultures et aquacultures constituent aussi un réservoir important [155, 156] avec un rôle semble-t-il majeur des *Aeromonas* [157].

Même si comme chez l'homme, les prévalences varient selon les espèces animales, les espèces bactériennes et les phénotypes de résistance retenus, il semble que les animaux de la ferme constituent un réservoir en IR plus important que les animaux de compagnie pour lesquels les prévalences observées sont moindres : 22 % de portage en IR à partir d'*E. coli* commensaux chez des chiens et chats dans cette étude [158] *versus* 52% de portage chez du bétail, des porcs, et des poulets, ou encore 29 % de portage (27 % d'IR de classe 1, 2 % d'IR de classe 2) dans cette autre étude portant sur des isolats cliniques d'*E. coli* isolées également de chiens et chats [159]. Les prévalences en IR chez les animaux sauvages sont quant à elles encore plus faibles, voire même nulles selon certaines études [160, 161].

Les descriptions d'IR chez les animaux de la ferme sont très nombreuses notamment chez les bovins [59, 162, 163], les porcins [126, 164, 165] et la volaille [116, 127, 166, 167]. Une étude rapporte ainsi une prévalence en IR de classe 1 de 34 % chez des salmonelles isolées d'animaux de la ferme [168], une autre fait état d'une prévalence de 30 % d'IR de classe 1 sur plus de 300 souches d'*E. coli* isolées de bovins, porcins et volailles [169]. Les chiffres les plus importants concernent les porcins et les volailles, peu de données sont disponibles concernant les ovins [170]. Les portages digestifs en IR des porcs en bonne santé sont généralement retrouvés à des taux très

importants, que ce soit à partir de salmonelles commensales (45 % d'IR de classe 1 et 17 % d'IR de classe 2 dans une étude au Chili [171], 51 % dans une autre étude au Japon [172]), ou à partir d'*E. coli* commensaux (23 % d'après une étude coréenne [173]). Des taux élevés ont été décrits chez les porcs malades avec par exemple une prévalence de 64,2 % en IR de classe 1, à partir d'*E. coli* isolées de diarrhées [174]. Les volailles constituent également un réservoir majeur d'IR, deux études, grecque et coréenne, ont décrit des taux de portage d'IR de classe 1 de l'ordre de 45-50% chez des *E. coli* commensaux [145, 173] ; des chiffres comparables ont été retrouvés dans une étude chinoise chez des poulets malades (prévalence de près de 50 %) [167].

Les chiffres de prévalence constatés, bien que déjà élevés sont très vraisemblablement sous-estimés. En effet, la quasi-totalité des auteurs ne s'intéresse qu'aux BGN, voire même à une seule espèce bactérienne, qui plus est sans passer par une étape d'enrichissement de l'échantillon. Autrement dit, seules les BGN majoritaires sont isolées et analysées pour estimer le portage en IR. Une étude s'intéressant à la litière de poulet a ainsi montré une prévalence en IR de classe 1 de quasiment 100 %, imputable essentiellement aux bactéries à Gram positif qui représentaient plus de 85 % des bactéries présentes [127]. Ce portage par des BGP a été retrouvé sur le sol de porcheries et sur des échantillons de selles au sein de bactéries du genre *Arthrobacter* et *Corynebacterium* avec des prévalences non négligeables : 12 % à partir du sol, 17 % à partir des selles [126]. Une autre étude menée chez les bovins a montré que les chiffres obtenus directement à partir d'extraits d'ADN de bouillons d'enrichissement de selles étaient bien supérieurs à ceux retrouvés à partir des BGN: 86 % d'IR de classe 1 et 94 % d'IR de classe 2 avec la technique d'enrichissement *versus* « seulement » 50 % et 28 % avec la culture conventionnelle [163].

Les produits dérivés de la viande ont aussi fait l'objet d'études recherchant les IR, notamment à partir des bactéries du genre *Salmonella*. Une étude américaine en 2001 s'est intéressée à de la viande hachée et a montré que sur 200 échantillons, 20 % renfermaient des salmonelles et près de 50 % d'entre elles étaient porteuses d'IR [175]. De même, en 2004 sur de la viande achetée en Chine et aux Etats-Unis, 54 % des salmonelles résistantes à au moins deux antibiotiques étaient porteuses d'IR [176] ; en 2005, une étude semblable menée en Allemagne en 2005 a retrouvé une prévalence en IR de 65 % pour les IR de classe 1 et 10 % pour ceux de classe 2 [177]. Une autre étude norvégienne menée sur de la viande et des produits dérivés d'origine bovine, ovine, porcine ou aviaire a retrouvé une prévalence en IR de 18 % à partir de souches d'*E. coli* résistantes à au moins un antibiotique testé [178]. D'autres études plus récentes ont retrouvé des taux d'IR de plus de 40 % et même de 60 % à partir d'*E. coli* isolés de viandes de poulet et de dinde [179, 180]. La présence d'IR dans la chaîne alimentaire est problématique : outre les risques liés aux souches pathogènes, les IR peuvent être une source de dissémination de gènes de résistance auprès des consommateurs [181].

### **3. Dans l'environnement**

Les sols et milieux aquatiques naturels sont une source importante d'IR. Une étude a rapporté dès 1999 une prévalence de 3,6 % d'IR de classe 1 à partir de 3000 BGN isolées d'un estuaire en Ecosse [182]. Des études plus récentes retrouvent des chiffres un peu plus importants : une étude portant sur des rivières turques a recensé une prévalence de 7,6 % d'entérobactéries porteuses d'IR de classe 1 et 2,7 % porteuses d'IR de classe 2 [183] ; une étude française a dénombré quant à elle 11 % d'IR de classes 1 et 2 chez 279 *E. coli* isolés de la Seine avec des pourcentages variant de 2,7 %

à 14,7 % selon les lieux de prélèvements, le plus fort pourcentage étant constaté à l'embouchure du fleuve [184]. La plupart des études se sont intéressées à des bactéries ayant acquis des mécanismes de résistance aux antibiotiques ; selon les espèces bactériennes considérées, leurs résistances acquises et leurs origines géographiques, les prévalences retrouvées étaient de l'ordre de 30-40 % [185-187] avec des valeurs extrêmes qui oscillaient entre 15 % [188] et 66 % dans cette étude s'intéressant aux entérobactéries de phénotype BLSE [189].

Des équipes ont réussi grâce à l'emploi de techniques de qPCR à quantifier les IR de classe 1 à partir d'échantillons environnementaux [190-192] ; selon les auteurs, les quantités d'IR de classe 1 retrouvés à partir des rivières sont de l'ordre de  $10^3$ - $10^4$  à  $10^6$ - $10^7$  copies par litre [191], les différences s'expliquant vraisemblablement, outre l'emploi de techniques d'extractions et d'amplifications différentes, par des eaux de « qualité » différentes, certaines étant peu polluées par des activités anthropiques [192], d'autres au contraire étant plus « contaminées » par des activités industrielles ou agricoles [191]. Les ratios obtenus en normalisant ces valeurs par la quantité totale de bactéries (évaluée par quantification du gène codant l'ARN 16S) apportent une information plus pertinente car ils évaluent le nombre moyen d'IR par bactérie. Ce ratio, dans le cas des rivières et de leurs sédiments, est de l'ordre de 0,01 à 0,05, ce qui signifie que 1 à 5 % des bactéries hébergent un IR de classe 1 [190, 193]. Ces valeurs peuvent varier selon la qualité de l'eau analysée (eau de rivière, eau d'estuaire, eau de rejet industriel ou eau urbaine) avec des rapports pouvant osciller entre 0,0001 dans des sédiments d'estuaires préservés de toute activité humaine [192] à plus de 1, voire même 3 ou 4 dans des sédiments d'eaux urbaines ou industrielles pollués par des métaux lourds [193]. Une équipe a souligné ce lien entre ratio élevé d'IR par bactérie et

« mauvaise qualité écologique » de l'échantillon prélevé et a montré qu'il existait une corrélation entre présence d'IR de classe 1 et stress environnemental de type urbain [190]. A noter qu'il existe une certaine variabilité selon le type d'échantillon analysé (eau ou sédiments ou biofilms) pour un même site de prélèvement [192].

Plusieurs travaux ont montré que certains IR de classe 1 environnementaux n'étaient pas les mêmes que ceux isolés de souches cliniques ; ils peuvent être retrouvés chez des espèces bactériennes peu ou pas impliquées en bactériologie médicale tels que les genres *Acidovorax* ou *Azoarcus* [194], héberger des cassettes dont les gènes ne codent pas une résistance à un antibiotique [194-196]. Ces IR de classe 1 environnementaux, qu'il est possible de différencier des IR « cliniques » par des techniques d'électrophorèse capillaire en raison d'une diversité de séquences de l'intégrase *IntI1* [197], seraient en fait des IR de classe 1 ancestraux qui auraient évolué à partir de  $\beta$ -protéobactéries originelles [198].

### *III. Pression de sélection antibiotique et rôle des intégrons sur l'acquisition de résistances*

#### **A. La pression de sélection antibiotique**

Il est relativement difficile de trouver une définition claire et précise de cette terminologie pourtant très largement employée. L'Institut de Veille Sanitaire (InVS) donne une définition quelque peu complexe qui est la « présence d'antibiotique perturbant le métabolisme d'une souche bactérienne et favorisant son adaptation par l'apparition d'un mécanisme de résistance à cet antibiotique » (<http://www.invs.sante.fr/surveillance/resistance/glossaire.htm#p>). De façon plus explicite, il s'agit en fait d'un concept très général qui fait référence aux conditions environnementales qui favorisent l'émergence puis la diffusion de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, quel que soit le mode d'acquisition de cette résistance [199]. Il est généralement admis que la pression de sélection antibiotique est une condition indispensable à l'émergence et à la diffusion d'une bactérie résistante ; dans un environnement dépourvu d'antibiotiques, la bactérie résistante ne peut survivre.

*In vitro*, une pression de sélection antibiotique peut être exercée par l'expérimentateur de différentes façons dans le but, le plus souvent, de sélectionner des mutants résistants [200]. *In vivo*, cette pression est liée à la consommation des antibiotiques, estimée chaque année dans le monde à 100 000 à 200 000 tonnes (dont 50 à 70 % de  $\beta$ -lactamines), 50 % de la production étant destinée à l'homme et 50 % à l'animal [201]. Cette pression est clairement responsable de l'émergence et de la

diffusion de certaines bactéries, comme cela a par exemple été montré chez l'homme pour les pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) dont la prévalence dans un pays est corrélée à sa consommation de pénicilline ; la même association est retrouvée pour les *E. coli* résistants aux fluoroquinolones [202, 203].

La pression de sélection antibiotique s'exerce dans un premier temps à l'échelon individuel. Elle s'exerce auprès des bactéries responsables de l'infection mais surtout sur les bactéries non impliquées dans l'infection qui font partie des flores commensales: peau, muqueuses, et surtout tube digestif. Cet effet « invisible » pour le patient est considéré aujourd'hui comme un authentique effet indésirable de l'antibiothérapie. Ainsi, lors de chaque traitement antibiotique, on peut observer la sélection de bactéries résistantes au sein des diverses flores commensales de l'individu [204]. Sont ainsi sélectionnées des bactéries naturellement résistantes ainsi que des bactéries ayant acquis une résistance par mutation chromosomique ou apport de matériel étranger (par conjugaison, transformation, ou plus rarement transduction). Les flores commensales, notamment le colon, sont un lieu où l'inoculum bactérien est extrêmement important ( $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de selles) et où les échanges de matériel génétique sont privilégiés. Les conséquences collectives d'un usage « intensif » des antibiotiques sont l'émergence de bactéries résistantes qui peuvent ensuite diffuser soit par dissémination de souches résistantes entre individus soit par transferts de vecteurs génétiques de la résistance entre bactéries *via* des transferts horizontaux de gènes de résistance. Cette diffusion a lieu aussi bien en ville qu'à l'hôpital comme en témoigne par exemple l'émergence depuis quelques années d'entérobactéries productrices de BLSE, notamment celles de type CTX-M [205], et dont les supports génétiques variés permettent une efficacité de diffusion [206].

L'environnement joue également un rôle dans la diffusion de la résistance ; les antibiotiques utilisés en agriculture, en pisciculture ou encore en arboriculture, sont retrouvés sous forme native ou de métabolites dans les sols et les eaux où ils maintiennent une pression de sélection [207, 208]. Les techniques d'épandage de fumier ou lisier, voire de boues de stations d'épuration, entretiennent ce phénomène [Figure 10]. Les effluents et les stations d'épuration (STEP) sont d'ailleurs considérés comme de véritables « hot-spots » qui favorisent les échanges horizontaux de matériels génétiques en raison de concentrations bactériennes importantes, de la présence de bactéries d'origine différente (humaines, animales, environnementales), dans un environnement riche en matières organiques, et en présence de centaines de molécules antibiotiques ou de leur métabolites [209]. L'impact chez l'homme de cette pression de sélection antibiotique environnementale reste extrêmement difficile à évaluer étant donné la complexité des écosystèmes.

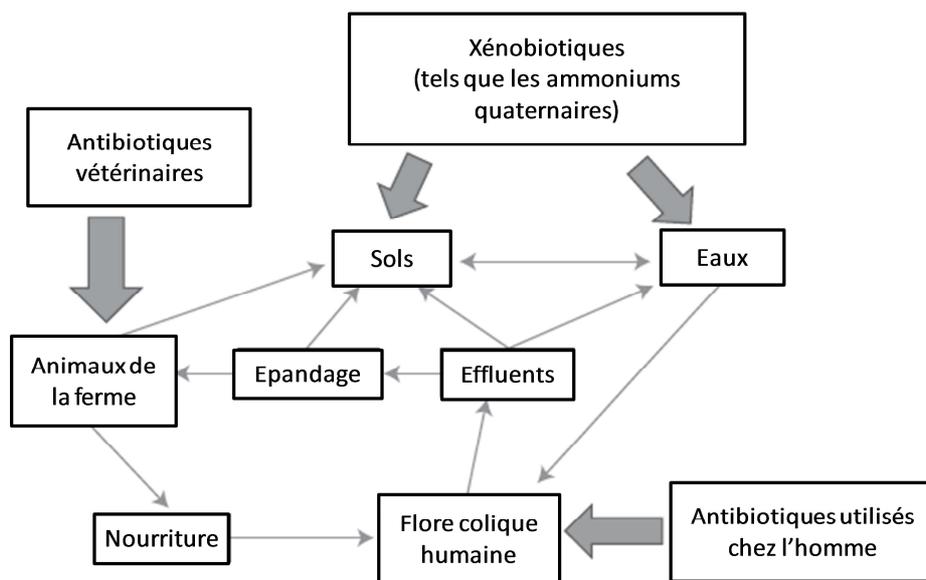


Figure 10 : Flux des gènes de résistance dans différents écosystèmes.

Les flèches larges représentent les pressions de sélection majeures qui s'exercent sur les gènes de résistance aux antibiotiques, les petites flèches montrent les directions des flux de gènes. D'après [205].

## **B. Pression de sélection antibiotique et intégrons de résistance**

### **1. Lien entre présence d'intégrons de résistance et multirésistance aux antibiotiques**

Indépendamment des IR, la multirésistance aux antibiotiques est une terminologie qui n'a pas de définition consensus ; elle est établie de façon arbitraire par les auteurs pour une étude donnée, ce qui non seulement pose des problèmes d'interprétabilité des résultats selon la « stringence » employée mais aussi empêche toute comparaison entre les études. Les paramètres employés pour définir la multirésistance tiennent compte de nombreux facteurs, les deux principaux étant le panel d'antibiotiques choisi et le chiffre retenu pour définir la multirésistance (résistance à 2, 3, parfois 4 antibiotiques). Les résultats peuvent ainsi être très différents et voir leur interprétation changer selon le choix et le nombre de familles d'antibiotiques testés, mais aussi le choix et le nombre de molécules testées au sein de chaque famille. En effet, un seul et même mécanisme de résistance peut toucher plusieurs molécules et faire considérer une souche comme multirésistante, alors même que d'autres mécanismes ne touchent parfois qu'un seul antibiotique. Enfin, les notions de résistance naturelle et de résistance acquise sont rarement prises en compte, ce qui conduit à assimiler entre elles des souches réellement multirésistantes à d'autres qui en fait le sont déjà naturellement. Il semble ainsi judicieux d'aller plus loin dans l'analyse et de raisonner en termes de phénotype de résistance acquis ou de résistance à une famille d'antibiotiques plutôt qu'en termes de molécules *stricto sensu*, tout en sélectionnant un panel d'antibiotiques adapté à la problématique initialement posée.

Des dizaines de travaux ont étudié le lien entre présence d'IR et multirésistance bactérienne, notamment en ce qui concerne les entérobactéries [210-214]. Les travaux de Martinez-Freijo ont souligné dès 1998 l'association entre IR et moindre sensibilité aux antibiotiques [214] : sur 163 souches bactériennes isolées de 14 hôpitaux européens différents, celles qui hébergeaient un IR (43 % de prévalence) étaient statistiquement plus résistantes aux aminosides (streptomycine et spectinomycine non testés), aux  $\beta$ -lactamines (notamment les pénicillines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases) et même aux fluoroquinolones. De même, Leverstein-van Hall et collaborateurs ont montré en étudiant près de 900 entérobactéries d'origines hospitalière et communautaire qu'il existait une relation significative entre IR et résistance à au moins 2 antibiotiques (71 % des BGN avec 2 résistances étaient *intI1+*), et ce, quelles que soient l'espèce considérée ou son origine [211]. Cette étude a montré (i) que la résistance aux antibiotiques suivants - tobramycine, gentamicine, cotrimoxazole, sulfaméthoxazole, ciprofloxacine, amikacine, pipéracilline/tazobactam, céfuroxime, ceftriaxone, amoxicilline/acide clavulanique, pipéracilline, et ampicilline - était significativement associée aux IR, (ii) que la résistance au sulfaméthoxazole, au cotrimoxazole, à la gentamicine, à la tobramycine, à l'ampicilline, à la pipéracilline, ou au céfuroxime était prédictive de la présence d'IR ( $p < 0,05$ ) chez *E. coli* et *P. mirabilis*.

Bien que les données soient moins nombreuses, le lien IR - multirésistance a également été retrouvé avec d'autres espèces bactériennes. Des travaux chinois récents ont montré sur près de 100 souches d'*A. baumannii* dont deux tiers hébergeant un IR de classe 1, que les taux de résistance des souches *intI1+* étaient plus importants que ceux des souches *intI-*. La différence était significative vis-à-vis de l'ensemble des antibiotiques employés en pratique clinique, par exemple plus de 85 % de souches

résistantes dans le groupe *intI1+* vs 30 % dans le groupe *intI1-* pour les pénicillines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, 66,7 % vs 16,6 % pour les fluoroquinolones [215]. Des résultats très comparables ont été retrouvés pour cette espèce par une équipe taïwanaise [216]. Concernant *P. aeruginosa*, le lien IR - multirésistance est moins évident [217], à l'exception peut-être de la résistance aux aminosides liée à la présence fréquente de cassettes *aac* et *aad* au sein d'IR de classe 1 [218]. Enfin, même si les données sont à prendre avec précautions car liées à l'épidémiologie, l'équipe chinoise qui a détecté des IR de classe 1 chez des souches de SARM (170 SARM dont 42,5 % *intI1+*) a montré qu'il existait une différence significative entre souches de SARM *intI1+* et souches *intI1-* vis-à-vis de l'amikacine, de la gentamicine, de l'érythromycine, de la tétracycline et du cotrimoxazole [133].

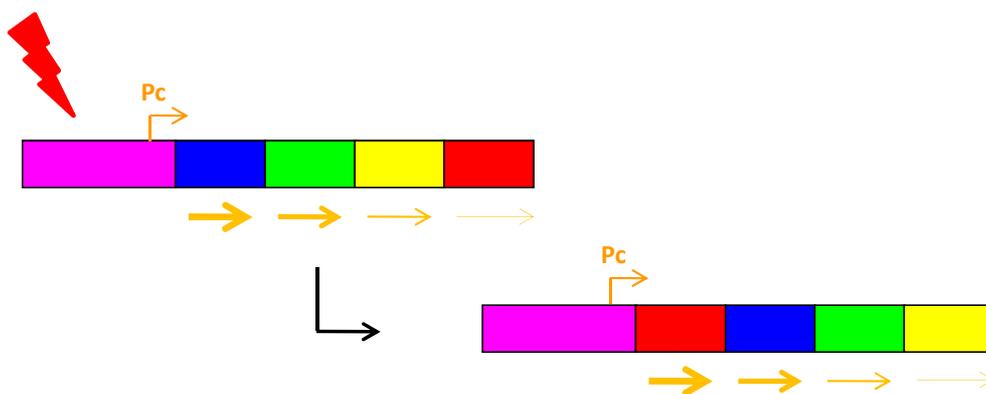
Il est cependant extrêmement difficile de lier la présence d'IR et la résistance à tel ou tel antibiotique tellement les études diffèrent entre elles selon les origines des bactéries, les espèces bactériennes considérées (entérobactéries, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*...), les espèces pour lesquelles un antibiogramme a été déterminé, les antibiotiques testés, les classes d'IR recherchées ou encore la définition apportée par les auteurs à la notion de multirésistance. Le caractère prédictif de la présence d'un IR vis-à-vis d'une résistance à tel ou tel antibiotique semble donc difficile à apporter, excepté peut-être vis-à-vis du cotrimoxazole (SXT) dont la résistance est très fortement associée à la présence des IR de classe 1 en raison de la présence fréquente d'une cassette *dfp* et du gène *sulI* de la région 3'. Ce lien a été souligné par plusieurs études aussi bien pour l'espèce *E. coli* [219-221] que pour les entérobactéries [222, 223] ou pour l'espèce *S. maltophilia* [224]. Les prévalences des IR de classe 1 parmi les souches résistantes au SXT varient en général entre 85 % et 100 % selon les études et les espèces.

## 2. Pression de sélection antibiotique et réarrangement de cassettes

Comme indiqué précédemment dans le chapitre sur la régulation de l'expression de l'intégrase, il a été clairement démontré que les antibiotiques induisaient l'expression de l'intégrase et les recombinaisons catalysées par cette intégrase conduisant à des intégrations ou excisions de cassettes [46]. Cependant, le système est plus complexe car chez les IR de classe 1, cette induction d'expression peut être sans effet en fonction du promoteur des cassettes présent, le promoteur PcS empêchant toute transcription du gène *intI1* [52]. De plus, les possibilités d'induction diffèrent selon les espèces bactériennes et les antibiotiques. En effet, il a été récemment démontré que si les quinolones, les  $\beta$ -lactamines et le triméthoprime sont communément reconnus comme inducteurs de la réponse SOS, les aminosides, le chloramphénicol et la tétracycline induisent la réponse SOS et l'expression de l'intégrase chez *V. cholerae* mais pas chez *E. coli* [225]. De plus, chez les IR de classe 1, il existe différentes combinaisons possibles Pc-P2 entraînant des possibilités très variées d'expression de la résistance pour une même cassette. *In vivo*, l'effet de la pression antibiotique sur le réarrangement des cassettes au sein d'un intégron et sur leur expression est donc très complexe et fait intervenir différents facteurs.

La pression de sélection antibiotique permettrait *via* l'induction de l'expression de l'intégrase des réarrangements de cassettes au sein de l'IR (ou l'acquisition de nouvelles cassettes) et favoriserait les bactéries dont les cassettes ont été réarrangées de façon telle que les cassettes nécessaires soient localisées au plus près du promoteur Pc [Figure 11]. L'expression ainsi plus importante du ou des gène(s) de cassettes permettrait alors à la bactérie d'assurer sa survie et sa diffusion dans le milieu [49].

L'avantage écologique majeur de cette régulation est que cela permet à la bactérie d'avoir à sa disposition un « pool » de gènes de résistance aux antibiotiques présents dans le réseau de cassettes de l'IR dont les plus éloignés de Pc sont « silencieux » et ne seraient exprimés qu'en cas de nécessité, réduisant ainsi le coût biologique de la résistance pour la bactérie [Figure 11], avec les effets pervers d'une bactérie qui paraîtrait phénotypiquement sensible à un antibiotique alors qu'elle a tout l'arsenal génétique lui permettant d'y résister si besoin.



**Figure 11 : Effet de la pression de sélection antibiotique sur les réarrangements de cassettes au sein d'un IR.**

L'hypothèse est la suivante : si l'on soumet une bactérie hébergeant un IR à une pression de sélection par un antibiotique (éclair rouge) dont la résistance est codée par la dernière cassette (couleur rouge), l'intégrase IntI serait capable d'exciser la dite cassette, puis de la réintégrer en une position plus proche de Pc. Ainsi, l'expression du gène qu'elle renferme est plus forte et la bactérie est capable de résister à l'antibiotique considéré. Pc : promoteur des cassettes. Les flèches oranges représentent les niveaux d'expression des gènes de cassettes qui sont d'autant plus importants que la cassette est proche de Pc. *NB : dans un souci de clarté, les sites attC n'ont pas été représentés.*

Cependant, les expériences de réarrangements de cassettes sous pression de sélection antibiotique ont été peu nombreuses et peu concluantes [35, 36]. Une équipe allemande a constaté des réarrangements de cassettes sous pression de sélection antibiotique mais ceux-ci se sont produits pour une cassette qui ne codait pas la

résistance à l'antibiotique qui assurait la pression de sélection [226]. Les auteurs ont en effet constaté une duplication de la cassette *oxa2* au sein de l'IR *oxa2-orfE* aboutissant à une plus grande résistance de la bactérie à l'ampicilline (*oxa2-orfE-oxa2*) alors même qu'ils appliquaient une pression de sélection par de la tétracycline. Leurs essais de pression de sélection par de l'ampicilline pour renouveler l'expérience n'a pas permis de mettre en évidence de nouveau la duplication d'*oxa2*, mais au contraire la présence d'une séquence d'insertion (IS) chromosomique en amont d'*oxa2* qui, *via* l'apport d'un promoteur, permettait d'augmenter le niveau d'expression du gène, conférant ainsi une plus grande résistance à la bactérie.

### **3. Etudes cliniques, animales et environnementales sur le lien entre pression de sélection antibiotique et présence d'intégrons de résistance**

La plupart des études s'intéressant à des écosystèmes soumis à une forte pression de sélection antibiotique va dans le sens d'une plus grande prévalence des IR, que ce soit chez l'homme, chez l'animal ou dans l'environnement.

#### *a. Chez l'homme*

Qui dit pression de sélection antibiotique chez l'homme dit hôpital et notamment unités de soins intensifs (USI). Des centaines d'études y décrivent la présence d'IR mais elles se focalisent sur une espèce bactérienne donnée, sur un phénotype de résistance

particulier, sur la caractérisation d'un IR inhabituel ou encore sur une situation épidémique qui implique un clone hébergeant un IR.

Peu d'études se sont intéressées à l'impact de la pression de sélection antibiotique sur les IR dans un contexte non épidémique. Les travaux de Njissen et collaborateurs ont essayé de répondre à cette question même si là encore les auteurs se sont focalisés uniquement sur les bactéries présentant une résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) [210]. L'étude a recherché pendant 8 mois à raison de 2 écouvillonnages rectaux par semaine la présence de bactéries résistantes aux C3G porteuses d'IR chez des patients hospitalisés en USI durant toute leur durée de séjour. Les résultats ont montré que 75 % des patients acquéraient des bactéries résistantes aux C3G porteuses d'IR durant leur séjour, et que le taux d'acquisition était de 8 à 10 cas pour 1000 journées d'hospitalisation en USI avec majoritairement des cas de transmission croisée. L'étude a aussi montré que la durée d'hospitalisation (ainsi qu'un âge jeune) était un facteur de risque d'acquisition de ces souches porteuses d'IR. Une étude grecque a montré que les prévalences des IR chez des bactéries pathogènes isolées d'hémocultures différaient selon l'origine communautaire (13,4 %), associée aux soins (40,7 %) ou nosocomiale (42,2 %) des entérobactéries isolées [212]. Cette équipe a recensé comme facteurs de risque d'acquisition d'IR, une durée d'hospitalisation plus longue, une hospitalisation antérieure dans une USI, ainsi qu'une administration antérieure (dans les 4 mois) d'une antibiothérapie. Dans cette étude, une administration antérieure d'aztréonam, de cotrimoxazole, de pénicillines  $\pm$  inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, d'aminosides ou de quinolones augmentait de façon significative le risque de portage d'IR, contrairement à une administration de céphalosporines, de carbapénèmes, de macrolides, de métronidazole, de glycopeptides ou de clindamycine.

En dehors du cadre hospitalier, quelques travaux se sont intéressés de façon plus ou moins directe à la pression de sélection antibiotique. Une étude précédemment citée concernant le portage digestif en IR des Amérindiens, banquiers/assureurs et éleveurs de porcs [79] investiguait le mode de vie des sujets dans le but avoué de comparer ces prévalences selon les pressions de sélection antibiotique « indirectes » exercées. Les prévalences en IR étaient différentes entre les 3 groupes de sujets aux modes de vie différents (6,4 %, 12,2 %, 18,5 % respectivement) et allaient dans le sens d'un effet de la pression de sélection antibiotique. D'autres études ont montré que les IR pouvaient être hébergés et persister dans des bactéries commensales malgré l'absence de traitement antibiotique récent et une exposition indirecte minime à ces molécules [227, 228].

Deux études apportent des éléments de réflexion concernant la pression de sélection par l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT). Le cas du Royaume-Uni apporte un exemple particulièrement intéressant : en 1995, le gouvernement britannique a décidé de limiter le plus possible l'usage du SXT dans le traitement des infections urinaires, suite à des essais cliniques montrant une efficacité équivalente du triméthoprime seul et à des cas d'allergie imputés au sulfaméthoxazole. Le fait de limiter considérablement la pression de sélection par les sulfamides laissait augurer d'une baisse de la prévalence des IR de classe 1. Or, il n'a pas été observé de baisse significative de la prévalence en IR de classe 1 chez des *E. coli* isolés de différents prélèvements en 1991 et en 1999: 16,4 % de souches IR+ en 1991 *versus* 17,5 % en 1999 [229]. Ces résultats mettent en avant le fait qu'une diminution même drastique de la pression de sélection antibiotique ne réduit pas nécessairement la résistance, la principale explication avancée était l'existence d'un lien génétique entre les IR et

d'autres marqueurs de résistance. Une étude de recherche clinique plus récente a évalué l'effet du SXT *versus* placebo sur le portage en IR des entérobactéries de la flore digestive ; il a été montré que l'effet était transitoire, avec une augmentation de la prévalence des IR dans le groupe antibiotique après 6 semaines de suivi post-traitement (80 % d'enfants porteurs d'entérobactéries *intI1+*), puis un retour aux valeurs initiales et comparables avec le groupe placebo après 12 semaines (20 à 30 % de porteurs) [230].

### *b. Chez l'animal*

Cinquante pour cent de la production mondiale d'antibiotiques est utilisée chez les animaux de ferme avec un emploi dans près de 90 % des cas à visée prophylactique ou en tant que promoteur de croissance (même si ce dernier usage est désormais interdit dans l'Union Européenne [231]). La « logique » voudrait donc qu'une forte prévalence en IR soit associée à cet usage important d'antibiotiques, mais les études ne vont pas toutes dans ce sens.

La prévalence d'IR de classe 1 inférieure à 5 % chez des *E. coli* résistants à l'ampicilline isolés de selles bovines dans une ferme écossaise pratiquant l'agriculture biologique était un premier argument en faveur de la relation faible pression de sélection antibiotique - faible prévalence d'IR [232]. Mais plusieurs autres études menées chez des bovins et volailles rapportent des résultats contraires. Une première étude américaine qui a comparé des populations d'*E. coli* entre fermes laitières biologiques et fermes laitières conventionnelles a retrouvé une association significative en terme de résistance (relation fermes biologiques - faible multirésistance des bactéries), mais sans pour autant retrouver de différences pour les IR [233]. De même, les taux élevés d'IR retrouvés à la fois dans des poulaillers n'utilisant pas

d'antibiotiques et dans ceux où leur usage (cyclines et fluoroquinolones) y était systématique vont à l'encontre du lien pression de sélection antibiotique - IR [234]. Cette étude soulignait en outre que d'autres facteurs sont à prendre en compte tels que l'âge des poulets ou encore la litière et la façon dont celle-ci est renouvelée. Des travaux aux résultats discordants ont été publiés par une même équipe australienne à un an d'intervalle, alors que la méthodologie employée était la même, basée sur la recherche d'IR directement à partir d'ADN extraits de bouillons d'enrichissement de selles. Les travaux se sont intéressés à la comparaison du portage digestif en IR de classes 1 et 2 chez des bovins élevés selon 3 modes d'élevage différents : fermes biologiques, élevage avec nourriture du bétail à l'herbe, élevage avec nourriture du bétail aux grains [235, 236]. La première étude publiée en 2008 a montré des prévalences en IR de classe 1 de 100 % dans les 3 groupes (idem pour les IR de classe 2 à l'exception d'un groupe où elle était moindre) laissant suggérer que le mode d'élevage n'avait aucun impact sur le portage en IR [235], alors même que la deuxième étude publiée en 2009 montrait des prévalences croissantes entre les 3 groupes aussi bien pour les IR de classe 1 (25 %, 52 %, 71 % respectivement) que pour ceux de classe 2 (11 %, 30 %, 62 %) [236], suggérant au contraire que la pression de sélection antibiotique influençait le portage en IR. L'étude la plus récente sur le sujet s'est intéressée à l'usage des antibiotiques en tant que promoteurs de croissance, pratique durant laquelle les antibiotiques sont administrés à des concentrations sub-thérapeutiques [237]. Cette étude canadienne a comparé la prévalence des IR de classe 1 à partir d'*E. coli* résistants à la tétracycline chez 3 groupes de bovins : un premier groupe ne recevant pas d'antibiotique, un deuxième recevant des cyclines et un troisième une association cyclines et sulfamides. Les analyses menées après 197 jours d'administration d'antibiotiques ont montré que les taux d'IR étaient

significativement différents entre les 3 groupes avec des prévalences respectives de 7 %, 28 % et 33 % ; suite aux analyses génétiques des bactéries et IR, les auteurs concluaient que la pression de sélection antibiotique était responsable à la fois de la diffusion clonale de bactéries porteuses d'IR mais aussi du transfert horizontal des IR *via* des plasmides conjugatifs.

Enfin, les prévalences du portage digestif en IR diffèrent selon le mode de vie des animaux et donc vraisemblablement selon leur exposition à une pression de sélection antibiotique. Une étude de 2006 a ainsi retrouvé à partir d'*E. coli* commensaux des prévalences de portage en IR nulles chez des animaux sauvages vivants éloignés de l'homme (en Antarctique et au Gabon) alors qu'elles étaient respectivement de 7 % et 16 % chez des animaux de ferme et des chiens vivant au contact de l'homme [160].

### *c. Dans l'environnement*

L'impact « indirect » de la pression de sélection antibiotique dans l'environnement est un paramètre de plus en plus étudié en ce qui concerne les IR ; de nombreux travaux publiés ces dernières années se sont ainsi intéressés aux effets environnementaux des rejets industriels, des épandages de fumier ou lisier sur les sols agricoles ou encore aux rejets des STEP.

Même s'il ne s'agit pas d'antibiotiques, la pollution des sols par les ammoniums quaternaires [238, 239] impacte sur la sélection des IR, ce qui paraît concordant en raison de l'existence des cassettes *qac*. L'une des premières études à ce sujet a ainsi montré que les bactéries isolées d'effluents d'une usine de laine employant de fortes quantités d'ammonium quaternaires étaient plus résistantes à cet antiseptique et

hébergeaient des IR de classe 1 associés dans 95 % des cas à la cassette *qacE* [238]. La prévalence d'IR de classe 1 dans les bactéries isolées des sols contaminés par ces effluents traités par filtration sur lit de roseaux était de 0,65 % (rapport de la quantité de gène *intI1* par celle du gène codant l'ARNr 16S), alors même que la prévalence chez des bactéries isolées de de sols non pollués était inférieure de plus de 2 log (0,0036 %) [240].

En agriculture, l'épandage est une technique couramment utilisée pour assurer une meilleure fertilité des sols ; les études montrent que 30 à 90 % des antibiotiques vétérinaires sont éliminés avec le fumier ou le lisier à raison de plusieurs milligrammes par kilogramme de matière ; ils sont ensuite retrouvés pour les plus stables d'entre eux (cyclines, sulfamides, macrolides) dans les sols à des concentrations de l'ordre de plusieurs microgrammes par kilogramme [241]. L'une des premières équipes travaillant sur épandage et IR a montré qu'il existait une dynamique au sein des IR avec un effet sur leur abondance et leur diversité en fonction de la présence ou non d'antibiotiques rajoutés expérimentalement dans du fumier. Un mois après épandage de fumier de porc additionné de sulfamides, outre une quantité plus importante de bactéries résistantes aux sulfamides, les auteurs ont constaté, à partir du sol, la présence d'IR non retrouvés à J1, avec de nouveaux réseaux de cassettes contenant plusieurs variants de cassettes *aadA* [242]. La même équipe en utilisant différents fumiers de porc de différentes origines a confirmé que leur épandage était une source importante d'IR de classe 1 et de cassettes *aadA* [243]. Une autre équipe travaillant sur l'épandage de fumier additionné de sulfamides et de cyclines a constaté une prévalence en bactéries résistantes aux sulfamides plus importante à partir des sols après application de fumier qu'à partir des

sols avant application, avec des bactéries hébergeant de façon inattendue plus d'IR de classe 2 que d'IR de classe 1 [244]. Les données les plus pertinentes émanent de la même équipe anglaise qui a quantifié le gène *int11* par qPCR. A partir de fumier de porc pour lequel la prévalence en IR de classe 1 était estimée à 0,65 %, le nombre de bactéries du sol qui hébergeaient un IR de classe 1 était multiplié par 50 un jour après l'épandage du fumier (0,01 % *versus* 0,0002 % à J0) et cette proportion restait 20 fois supérieure (0,004 %) près de 300 jours après [245]. Les boues de STEP sont également couramment employées pour l'épandage des sols agricoles ; la prévalence en IR de classe 1 est supérieure à celle des fumiers, estimée dans cette étude à 1,01 % [240]. De la même façon que pour l'épandage de fumier, les sols bénéficiant de l'épandage de boues de STEP voient les IR de classe 1 persister pendant plusieurs années : les taux diminuent au fil des années, passant de 0,36 % après 1 mois à 0,01 % après 2 ans, tout en restant près de 100 fois supérieurs à ceux constatés dans des sols vierges de tout épandage (0,0036 %) [240].

Les STEP sont des lieux où sont retrouvés des centaines de molécules antibiotiques ou leur métabolites à des concentrations sub-inhibitrices [209]. Elles constituent l'un des principaux réservoirs hydriques en IR et sont très propices à des transferts horizontaux de gènes de résistance [246]. Des dizaines de travaux décrivent la présence de bactéries porteuses d'IR isolées à partir de STEP ; les prévalences déterminées à partir de ces bactéries varient selon les études entre 10% et 35 % pour les IR de classe 1 [247-253] et entre 4 et 7 % pour les IR de classe 2 [248, 249, 251, 253]. Une seule publication décrit la présence de bactéries porteuses d'intégrons de classe 3 [64], même si des analyses d'hybridation sur des extraits d'ADN total ont montré qu'ils

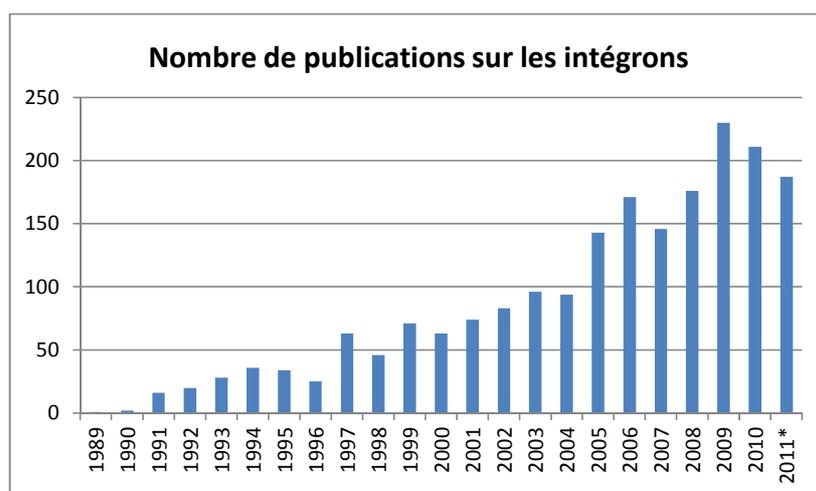
étaient présents en grande quantité [65]. Les valeurs des taux de prévalence diffèrent bien entendu selon les espèces bactériennes recherchées (*E. coli* le plus souvent) et le type de STEP sélectionné (STEP dédiées aux effluents urbains, hospitaliers, d'abattoir...); elles sont bien entendu plus importantes dès lors que les auteurs se focalisent sur des bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques [254]. Bien que les résultats doivent être interprétés avec beaucoup de précautions en raison d'une analyse focalisée sur les seules bactéries isolées et qui ne peut donc être exhaustive, les études précédemment citées tendent à montrer que le traitement des effluents par les STEP ne permettrait pas de diminuer la prévalence des IR [247], voire même l'augmenterait [248, 252].

Les travaux menés directement à partir d'ADN extraits d'effluents de STEP apportent des données plus pertinentes à la fois en ce qui concerne la prévalence des IR au sein des STEP, mais aussi sur les capacités de celles-ci à les éliminer. Les études quantitatives concernent les seuls IR de classe 1 et mettent en évidence, de façon attendue, des quantités bien plus importantes que celles retrouvées dans les eaux de rivière ; elles oscillent entre  $10^{10}$  et  $10^{12}$  copies par litre d'effluents entrant dans la STEP [191, 250]. Les quantités mesurées dans les boues activées sont de l'ordre de  $10^9$  à  $10^{12}$  copies par litre. Contrairement aux études menées à partir des bactéries, ces études quantitatives montrent que la quantité d'IR diminue de l'ordre de 3 log après passage dans la STEP avec une quantité estimée de  $10^7$  à  $10^9$  copies par litre d'effluent de sortie. Cette réduction relative des IR n'est cependant pas toujours constatée et diffère selon les procédés de traitement des eaux de la STEP, les procédés de méthanisation thermophile semblant être les plus efficaces [255, 256].

Enfin, deux études se sont intéressées à l'effet « grandeur nature » d'une pression de sélection antibiotique exercée au niveau des STEP en analysant les bactéries porteuses d'IR issues de STEP dédiées à des usines de production d'antibiotiques. La première étude concernait la STEP d'une usine de production de pénicilline G [257], l'autre d'une usine de production d'oxytétracycline [258]. Si dans les deux cas, les bactéries isolées de l'effluent et de la rivière en aval de l'usine présentaient des multirésistances plus importantes que les bactéries isolées de la rivière en amont de l'usine, les prévalences en IR de classe 1 étaient, elles, très différentes : concernant l'usine de production de pénicilline G, la prévalence était de 14 % (9 % dans la rivière en aval, 0 % en amont), soit une valeur habituellement constatée (voir paragraphe II.C.3), alors que pour l'usine de production d'oxytétracycline, la prévalence atteignait 97,4 % (86,2 % dans la rivière en aval, 3 % en amont) montrant clairement un effet sélectif de cet antibiotique sur les bactéries porteuses d'IR de classe 1. A noter que la faible diversité des réseaux de cassettes (*aad*, *dfr*, *qac*) ne pouvait expliquer la multirésistance des bactéries. Cette sélection des IR s'expliquait vraisemblablement par le support génétique plasmidique commun des gènes *tet* et des IR.

## Conclusion

Découverts il y a maintenant plus de 20 ans, les intégrons sont plus que jamais d'actualité, comme en témoigne le nombre croissant de publications s'y rapportant [Figure 12]. Les 3-4 dernières années auront été très riches d'enseignement et ont permis de dévoiler quelques-uns des secrets des IR, aussi bien sur le plan mécanistique que sur le plan épidémiologique. Malgré une plate-forme fonctionnelle somme toute assez simple, les processus de recombinaison et de régulation de l'expression de l'intégrase et des cassettes se révèlent très complexes mais permettent *in fine* d'assurer à la bactérie, avec un coût énergétique minime, une importante plasticité qui lui offre de formidables capacités d'adaptation et d'évolution, à l'origine vraisemblablement de leur succès et de leur très large répartition dans tous les écosystèmes microbiens. Il reste encore beaucoup de travaux à réaliser afin d'explorer la « partie immergée de l'iceberg » ; l'effet *in vitro* et *in vivo* de la pression de la pression de sélection antibiotique sur ce support génétique en est un.



**Figure 12 : Nombre de publications et de citations sur les intégrons depuis leur découverte.**

Avec la requête « integron », il existe environ 2000 publications recensées à partir du site « PubMed » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>) (\* requête effectuée le 28/11/2011).

# **Chapitre 2 :**

## **Présentation du travail de thèse**

Les recherches menées durant ce travail de thèse ont porté sur deux axes :

- un **axe fondamental** visant à comprendre quel est l'effet *in vitro* d'une pression de sélection exercée par les antibiotiques sur le réarrangement des cassettes au sein d'un intégron,
- un **axe épidémiologique** visant à évaluer la présence des intégrons dans différents écosystèmes, selon l'exposition des bactéries qui les hébergent à différentes pressions de sélection antibiotique. Une technique de PCR en temps réel (qPCR) a ainsi été développée dans un premier temps avant de pouvoir l'appliquer à partir de souches bactériennes et d'échantillons biologiques plus complexes permettant ainsi de mieux appréhender l'importance *in vivo* des IR et leur lien avec la pression de sélection antibiotique.

Le travail concernant l'**axe fondamental** est basé sur le fait qu'il est considéré, mais non démontré à ce jour, que la pression de sélection antibiotique va favoriser les bactéries dont les cassettes ont été réarrangées au sein de l'intégron de façon telle à rapprocher les cassettes nécessaires au plus près du promoteur Pc. Pour explorer la possibilité d'une telle régulation par réarrangement de cassettes, nous avons construit un intégron synthétique avec 4 cassettes dont la dernière code une résistance au chloramphénicol. Nous avons ensuite testé l'effet de la pression de sélection par le chloramphénicol sur les capacités de réarrangement de cassettes, et ceci en fonction des différents variants de Pc ou d'expression induite ou constitutive de l'intégrase. Ce travail présenté ci-après sous forme d'article sera soumis pour publication dans une revue internationale.

Le travail relatif à l'axe épidémiologique a été subdivisé en plusieurs parties :

- la **Partie 1** concerne la mise au point d'une technique de PCR en temps réel (qPCR) multiplex permettant de détecter et de quantifier avec les meilleures sensibilités et spécificités possibles les 3 principales classes d'intégrons de résistance. Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale en 2010 dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Elle a en outre permis pour partie le dépôt d'un brevet aux Etats-Unis en septembre 2010.
- la **Partie 2** concerne la caractérisation d'IR chez des isolats bactériens détectés grâce à la technique de qPCR : (i) un IR de classe 1 retrouvé chez un isolat clinique de *Corynebacterium diphtheriae*, ce travail a fait l'objet d'une publication internationale en 2011 dans *Emerging Infectious Diseases* ; (ii) un IR de classe 3 retrouvé chez un *Enterobacter cloacae* isolé d'un effluent hospitalier, ce travail sera soumis pour publication dans une revue internationale.
- la **Partie 3** s'intéresse à la détection d'IR directement à partir d'échantillons de selles humaines chez des individus soumis à différentes pressions de sélection antibiotique. Ces données ont été comparées aux résultats obtenus à partir de la culture bactérienne. Ces travaux présentés en français seront soumis pour publication dans une revue internationale.
- La **Partie 4** s'intéresse au lien entre les IR et la résistance aux antibiotiques avec comme objectif principal d'évaluer la valeur prédictive du marqueur IR. Ce travail a été mené au sein du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU Limoges à travers le protocole « Hemotion » pour lequel nous avons détecté la présence d'IR directement à partir de flacons d'hémocultures positives à bacilles à Gram négatif.

## ***Axe fondamental***

---

***Effet in vitro d'une pression de sélection exercée par les antibiotiques sur  
le réarrangement des cassettes au sein d'un intégron de résistance***

L'objectif de nos travaux était d'évaluer la capacité de l'intégrase à réarranger des cassettes au sein d'un IR chez une bactérie soumise à une pression de sélection antibiotique. Nous avons construit un IR synthétique avec 4 cassettes dont la dernière codait une résistance au chloramphénicol (Cm) et testé l'effet de la pression de sélection par le Cm sur les réarrangements de cassettes, en fonction de différents variants de Pc et avec une expression constitutive ou induite de l'intégrase.

Une souche d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  hébergeant l'IR *intI1-aac(6')Ib-dfrA15-aadA1-catB9* a été soumise à des cultures continues en concentrations croissantes de Cm. Les expériences ont été menées avec les variants PcS, PcW<sub>TGN-10</sub> et PcW, avec l'intégrase exprimée de façon basale ou déréprimée par mutation du site de fixation de LexA. Des expériences ont également été menées avec une intégrase surexprimée en *trans* sous le contrôle d'un promoteur fort. La position de *catB9* a été déterminée par PCR chaque jour du protocole sur 100 colonies différentes.

Tous les réarrangements obtenus ont montré un rapprochement de *catB9* de Pc, augmentant ainsi le niveau de résistance de la bactérie au Cm. Le principal réarrangement obtenu, quel que soit le type de Pc, a été *intI1-aac(6')-Ib-catB9*. Lorsque l'intégrase était surexprimée, les durées des protocoles de pression de sélection étaient raccourcis mais le nombre des réarrangements restaient identiques, excepté pour l'intégrase IntI1<sub>R32\_H39</sub> qui est l'intégrase correspondant au variant PcW.

Nous avons pu montrer dans notre modèle expérimental que l'intégrase était capable de générer des réarrangements de cassettes qui conduisaient à un rapprochement de *catB9* de Pc, majoritairement par délétions des deux cassettes *dfrA15* et *aadA1*. Les résultats sont présentés sous forme de manuscrit pour soumission pour publication dans un journal international.

# **Extent of Class 1 Integron Gene Cassettes Rearrangements Selected Under Antibiotic Pressure**

Olivier Barraud<sup>1,2,3</sup>, François Denis<sup>1,2,3</sup> and Marie-Cécile Ploy<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Univ Limoges, Faculté de Médecine, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire des Microorganismes EA3175, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France.

<sup>2</sup>INSERM, Equipe Avenir, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France.

<sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges, 2 Av. Martin Luther King, 87042 Limoges CEDEX, France.

\* Corresponding author.

E-mail: [marie-cecile.ploy@unilim.fr](mailto:marie-cecile.ploy@unilim.fr)

Phone (+1) 33 5 55 05 67 27; Fax: (+1) 33 5 55 05 67 22

Running head:

Key words:

Class 1 integron

Antibiotic pressure

Antibiotic resistance

# *Axe épidémiologique*

---

*Effet in vivo de la pression de sélection exercée par les antibiotiques  
sur la prévalence des intégrons de résistance*

## **Partie 1 :**

**Mise au point d'une PCR en temps réel multiplex  
pour la détection des intégrons de résistance de  
classe 1, 2 et 3.**

L'objectif était de développer une technique de PCR en temps réel (qPCR) permettant la détection simultanée des 3 principales classes d'IR non seulement sur des souches, mais aussi à partir d'environnements génétiques plus complexes.

Nous avons dessiné 3 couples d'amorces et 3 sondes Taqman<sup>®</sup> ciblant les gènes d'intégrases *intI1*, *intI2* et *intI3*. La sensibilité et l'efficacité des réactions de PCR ont été déterminées avec des gammes témoins de plasmides, la spécificité avec des souches témoins hébergeant ou non un intégron. Des gammes croisées de chacun des 3 gènes *intI* ont été testées. La technique a ensuite été appliquée sur des souches cliniques et sur des échantillons biologiques (urine, sérum, liquides biologiques...).

Pour chacun des 3 gènes, et quelle que soit la quantité des autres gènes présents, la sensibilité de la réaction était de  $10^2$  copies par réaction. Dans les différentes conditions expérimentales, les amplifications étaient spécifiques et la technique s'est révélée quantitative de  $10^3$  à  $10^7$  copies pour chacun des gènes *intI*. Les efficacités globales d'amplification étaient de 99 % pour *intI1*, 102 % pour *intI2* et 98 % pour *intI3*, avec un coefficient de variation inférieur à 2 %. La technique a permis la détection d'intégrons aussi bien à partir d'ADN extrait de souches cliniques qu'à partir d'ADN extrait d'échantillons biologiques sans culture préalable.

La PCR développée est une technique facile, spécifique et sensible de détection des IR. Elle permet de cribler rapidement des centaines d'échantillons et d'envisager ainsi des études épidémiologiques à grande échelle.

## **Partie 2 :**

### **Caractérisation d'intégrons de résistance chez des isolats bactériens**

La technique de qPCR nous a permis de réaliser un « screening » rapide des IR parmi des milliers de souches bactériennes isolées lors des différents travaux entrepris au sein du laboratoire ou *via* un travail de collaboration avec d'autres équipes de recherche.

Deux isolats ont présenté des IR inédits leur conférant une résistance aux antibiotiques :

- une souche de *Corynebacterium diphtheriae* toxigène hébergeant l'IR de classe 1  $\Delta int11-dfrA16-qacH$  lui conférant une résistance inhabituelle au triméthoprim-sulfaméthoxazole. L'environnement génétique a montré que cet intégron délété dans sa partie 5' était présent au sein d'un transposon composite. Ce travail mené en collaboration avec le Centre National de référence des Corynébactéries toxigènes (Institut Pasteur, Paris) a été accepté en 2011 pour publication dans *Emerging Infectious Diseases*.
- une souche d'*Enterobacter cloacae* isolée d'un effluent hospitalier avec l'IR de classe 3  $int13-bla_{OXA-10}-aac(6')-Ib$  lui conférant une résistance aux pénicillines et à certains aminosides. Cet intégron a pour environnement génétique un plasmide mobilisable de 9 kilobases. Ce travail présenté sous forme de manuscrit sera prochainement soumis pour publication dans une revue internationale.

# **Antibiotic-Resistant Class 3 Integron in a Hospital Effluent *Enterobacter cloacae* Isolate**

Olivier Barraud<sup>1,2,3</sup>, Magali Casellas<sup>4</sup>, Sandra Da Re<sup>1,2</sup>, François Denis<sup>1,2,3</sup>, Christophe Dagot<sup>4</sup>, and Marie-Cécile Ploy<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Univ Limoges, Faculté de Médecine, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire des Microorganismes EA3175, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France.

<sup>2</sup>INSERM, Equipe Avenir, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France.

<sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges, 2 Av. Martin Luther King, 87042 Limoges CEDEX, France.

<sup>4</sup>Univ Limoges, Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, ENSIL, 16 rue Atlantis Parc ESTER Technopole, BP6804, 87068 Limoges.

\* Corresponding author.

E-mail: [marie-cecile.ploy@unilim.fr](mailto:marie-cecile.ploy@unilim.fr)

Phone (+1) 33 5 55 05 67 27; Fax: (+1) 33 5 55 05 67 22

Running head:

Key words:

Class 3 integron

Effluent

Antibiotic resistance

## **Partie 3 :**

### **Prévalence du portage digestif des intégrons de résistance chez l'homme**

Les données de la littérature concernant le portage digestif en IR ont essentiellement été déterminées à partir des prévalences en IR constatées chez les bactéries à Gram négatif, notamment chez *E. coli*. Les chiffres déterminés chez des sujets sains oscillent entre 15 et 30 % de portage selon les études [144, 147]. Or, cette approche a l'inconvénient de se limiter aux seules bactéries cultivables sur les milieux utilisés qui sont généralement adaptés à des bactéries retrouvés en clinique. Peu d'études se sont intéressées à déterminer cette prévalence par une approche plus globale ; les travaux de Barlow réalisés chez l'animal ont montré des prévalences beaucoup plus importantes (> 85 %) dès lors que l'analyse était faite à partir d'un bouillon d'enrichissement de selles [163].

Le but de ce travail était de comparer deux approches d'étude de la prévalence du portage digestif d'IR de classe 1, 2 et 3 chez l'homme, (i) une approche conventionnelle basée sur la culture des BGN isolées des selles, (ii) une approche globale faite directement à partir de l'ADN extrait des selles, avec et sans étape d'enrichissement. Nous avons comparé par ces approches le portage digestif des IR chez des individus issus de 2 populations soumises à des pressions de sélection antibiotique différentes : (i) des patients hospitalisés en Unité de Soins Intensifs soumis *a priori* à une forte pression de sélection antibiotique, (ii) des patients de la « population générale » peu ou pas soumis à des traitements antibiotiques. Par ailleurs, une analyse concernant le lien entre IR et résistance aux antibiotiques des BGN isolés a été menée.

Ce projet a été soutenu par la Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation du CHU de Limoges avec un financement de 38 000 €. Il a été réalisé en collaboration avec le Centre d'Investigation Clinique (CIC-P 0801) du CHU de Limoges.

Deux cents cinquante (250) individus ont été inclus dans chacune des 2 populations étudiées. Seuls des IR de classe 1 et 2 ont été détectés ; aucun IR de classe 3 n'a été mis en évidence. L'approche globale a permis de détecter plus d'IR que l'approche conventionnelle : pour les 2 populations analysées, les prévalences des IR déterminées par l'approche globale sans étape d'enrichissement étaient près de 2 fois supérieures à celles déterminées par l'approche conventionnelle (environ 50 % *versus* 25 %). Avec une étape d'enrichissement, les prévalences dépassaient les 60 %.

Lorsque les données issues de l'approche conventionnelle étaient prises en compte, la différence de portage digestif des IR entre les 2 populations n'était pas significative : 22,8 % pour les patients de la population générale *versus* 28,4 % pour ceux hospitalisés en USI ; avec les données issues de l'approche globale sans étape d'enrichissement, la différence entre les 2 groupes était significative (43,6 % *versus* 53,2 %,  $p = 0,039$ ). La quantification des IR de classe 1 (estimée en nombre de copies du gène *intI1* par gramme de selles) n'a pas montré de différence significative entre les patients des 2 groupes.

La très large majorité des BGN isolés appartenait à la famille des entérobactéries (*E. coli* principalement) avec une diversité plus importante dans le groupe de patients hospitalisés en USI. Au sein des entérobactéries, le lien entre IR et multirésistance acquise aux antibiotiques a été montré, avec une significativité pour plusieurs antibiotiques : amoxicilline, streptomycine, triméthoprimé, sulfamides, cyclines... Cette significativité était plus importante et plus large pour les entérobactéries n'appartenant pas à l'espèce *E. coli* avec un lien fort pour les autres aminosides, les fluoroquinolones et la plupart des  $\beta$ -lactamines... Chez l'espèce *E. coli*, le marqueur IR s'est révélé avoir une très bonne valeur prédictive négative vis-à-vis de la résistance aux antibiotiques.

## **Matériels et Méthodes :**

### *Patients inclus*

Pour estimer une prévalence de portage d'IR de 20% avec une précision de 5%, un risque  $\alpha$  de 5% et une puissance de 80%, il a été déterminé qu'il était nécessaire de disposer de 246 individus dans chaque groupe (faible et forte pression de sélection par les antibiotiques).

Les critères d'inclusion étaient :

- Patients adultes (> 18 ans).
- Possibilité de recueillir les renseignements cliniques concernant une antibiothérapie récente (< 3 mois).
- Groupe 1 : faible pression de sélection par les antibiotiques.

Sujets appartenant au personnel de restauration du CHU de Limoges, convoqués de manière systématique par le Département de Santé au Travail et pour lesquels un examen bactériologique des selles est pratiqué dans le cadre du dépistage annuel systématique du portage sain de salmonelles et shigelles chez les professionnels des cuisines.

- Groupe 2 : forte pression de sélection par les antibiotiques.

Patients admis depuis au moins 48 heures dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU Limoges.

Il n'apparaissait pas nécessaire de réaliser un appariement entre les deux populations étudiées. En effet, l'analyse de la littérature n'a apporté aucun renseignement permettant de mettre en évidence un éventuel lien entre des facteurs tels l'âge ou le sexe et le portage digestif des IR.

De décembre 2007 à avril 2010, 500 patients différents issus des 2 groupes (250 dans chaque groupe) ont été inclus. Un prélèvement de selles a été obtenu pour chaque patient. L'antibiothérapie dans les 3 mois précédant le recueil de selles a été recherchée.

### *Ensemencement des échantillons*

La [Figure 1] résume les différentes étapes techniques du matériel et méthodes. 200 mg de selles étaient inoculés dans 5 millilitres de bouillon cœur-cerveille (AES) à 37°C pendant une nuit, sans agitation. Dix microlitres (10 µL) du bouillon d'enrichissement étaient ensemencés sur gélose Drigalski (bioMérieux). Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, les bacilles à Gram négatif (BGN) étaient repérés visuellement et isolés sur géloses Cled (bioMérieux) incubées 18 à 24 heures à 37°C.

### *Identification et antibiogramme des BGN*

L'identification des isolats a été réalisée à l'aide du système Vitek2 avec les cartes Vitek2-ID-GNB (bioMérieux). Un antibiogramme a été réalisé par diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM (<http://www.sfm-microbiologie.org/>) avec les 26 antibiotiques suivants :  $\beta$ -lactamines (amoxicilline, ticarcilline, amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline + acide clavulanique, céfoxitine, céfotaxime, ceftazidime, aztréonam, céfépime, imipénem), aminosides (streptomycine, spectinomycine, kanamycine, tobramycine, nétilmicine, amikacine, gentamicine, iséпамicine), quinolones (acide nalidixique, péfloxacine, ciprofloxacine), triméthoprime, sulfaméthoxazole, cotrimoxazole, tétracycline et chloramphénicol. Dans l'analyse des résultats, les souches intermédiaires (I) et résistantes (R) ont été agrégées

(I+R). La multirésistance a été définie comme la résistance acquise à au moins 3 antibiotiques testés. L'analyse n'a porté que sur les entérobactéries.

### *Extraction de l'ADN*

#### *- à partir des selles*

L'ADN total a été extrait à partir de 200 mg de selles en utilisant le kit QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Le volume d'élution était de 200 µL.

#### *- à partir du bouillon d'enrichissement*

Un millilitre (1 mL) du bouillon d'enrichissement était centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à température ambiante, puis l'ADN total était extrait à partir du culot avec le kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Le volume d'élution était de 200 µL.

#### *- à partir des BGN*

Les ADN bactériens ont été extraits par ébullition ("*boiling*") [33].

### *Détection des IR*

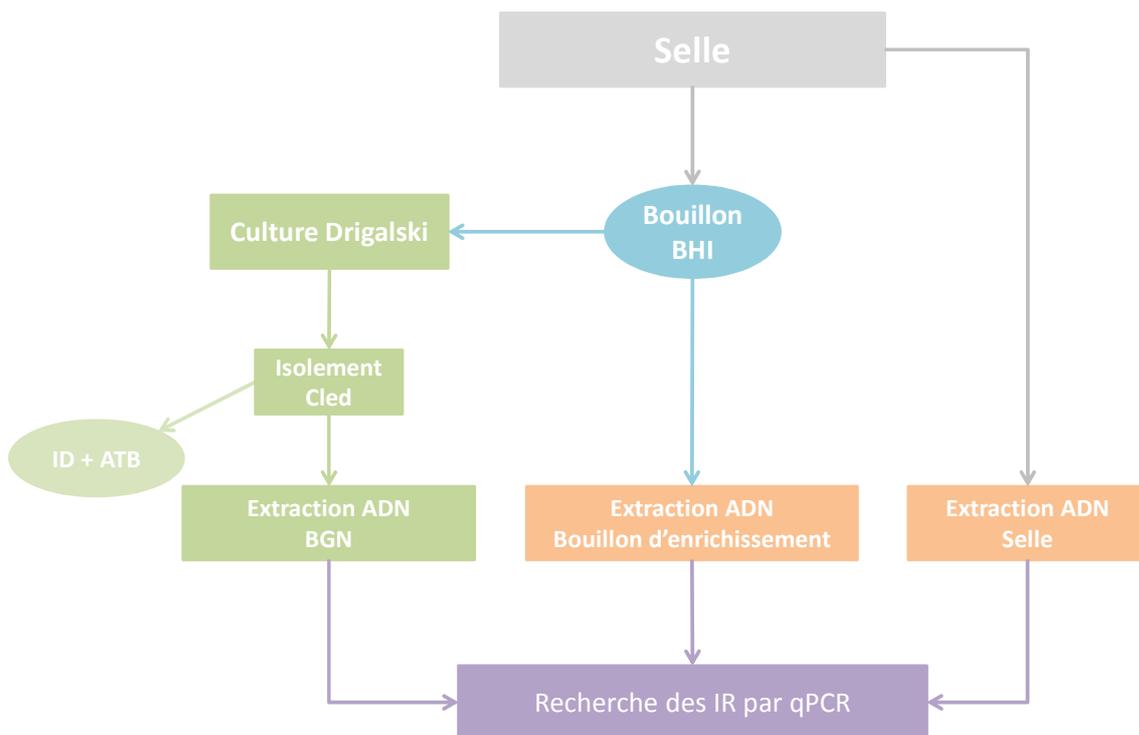
La recherche des 3 classes d'IR a été réalisée à partir des ADN extraits des selles, du bouillon d'enrichissement et des BGN (5µL) en employant la technique de qPCR développée et décrite précédemment dans cette thèse). L'appareil utilisé était le système SmartCycler II 2.0 (Cepheid®) ou le système MX3005P (Stratagene®). Pour tous les échantillons pour lesquels la qPCR intégron s'est révélée négative, une vérification de la présence d'inhibiteurs a été réalisée en ciblant le gène codant l'ARN ribosomal 16S.

## Quantification des IR

Le gène *int11* a été quantifié à partir de l'ADN extrait des selles de patients et rapporté en nombre de copies par gramme de selles.

## Tests statistiques

Le lien IR – multirésistance aux antibiotiques a été déterminé en employant le test du chi2. Un test exact de Fisher a été utilisé lorsque les effectifs étaient inférieurs à 5.



**Figure 1 :** Schéma représentant le processus de traitement des échantillons de selles.

BHI : *Brain Heart Infusion* = bouillon cœur-cervelle ; ID + ATB : identification et antibiogramme.

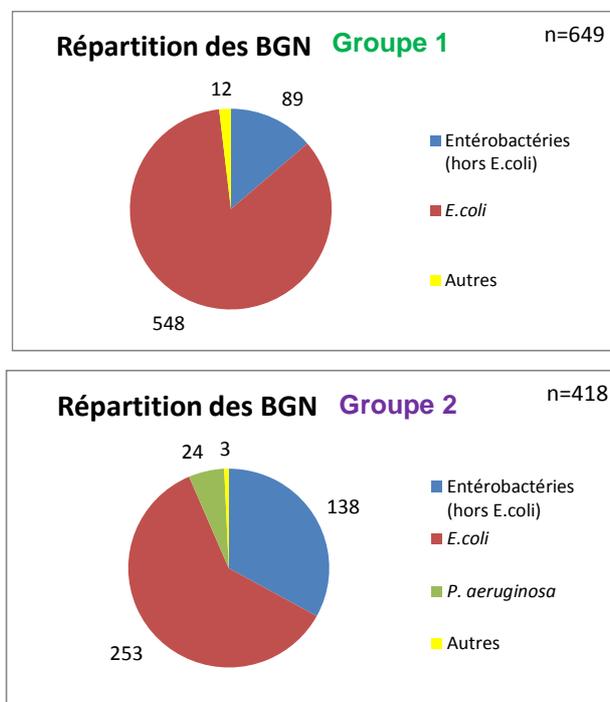
# Résultats :

## 1. Approche conventionnelle

### 1.1. Répartition des espèces bactériennes [Figure 2]

Dans le **Groupe 1**, au moins 1 BGN a été isolé à partir de 245 échantillons, soit chez 98 % des sujets. **649 BGN** ont été isolés (moyenne de 2,6 BGN par sujet), dont 98,2% d'entérobactéries. Des souches d'*E. coli* ont été identifiées chez 84,4 % des patients.

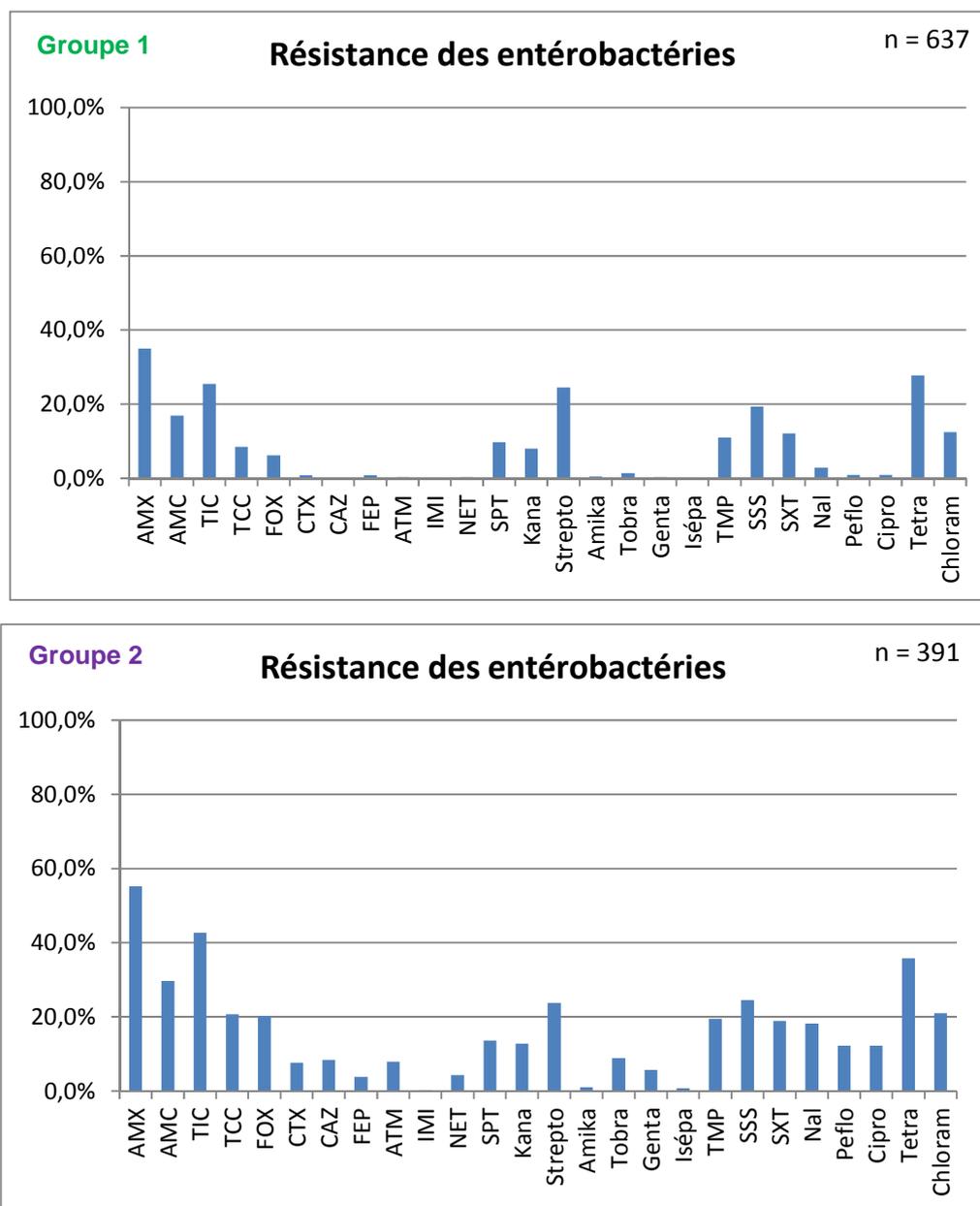
Dans le **Groupe 2**, au moins 1 BGN a été isolé à partir de 176 échantillons, soit 70,4 % des sujets ; aucune culture de BGN n'a donc été observée pour 74 patients (29,6 %). **418 BGN** ont été isolés (soit 1,67 BGN en moyenne par sujet), dont 93,5 % d'entérobactéries et 5,7% de *P. aeruginosa*. Des souches d'*E. coli* ont été identifiées chez 60,5 % des patients.



**Figure 2 :** Répartition des BGN isolés dans les 2 groupes. La catégorie « autres » rassemble les BGN appartenant aux genres *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* ou *Aeromonas*.

## 1.2. Résistance des souches bactériennes aux antibiotiques

Les résistances (I+R) des entérobactéries isolées des selles des patients des 2 Groupes ont été déterminées vis-à-vis des 26 antibiotiques testés [Figure 3].

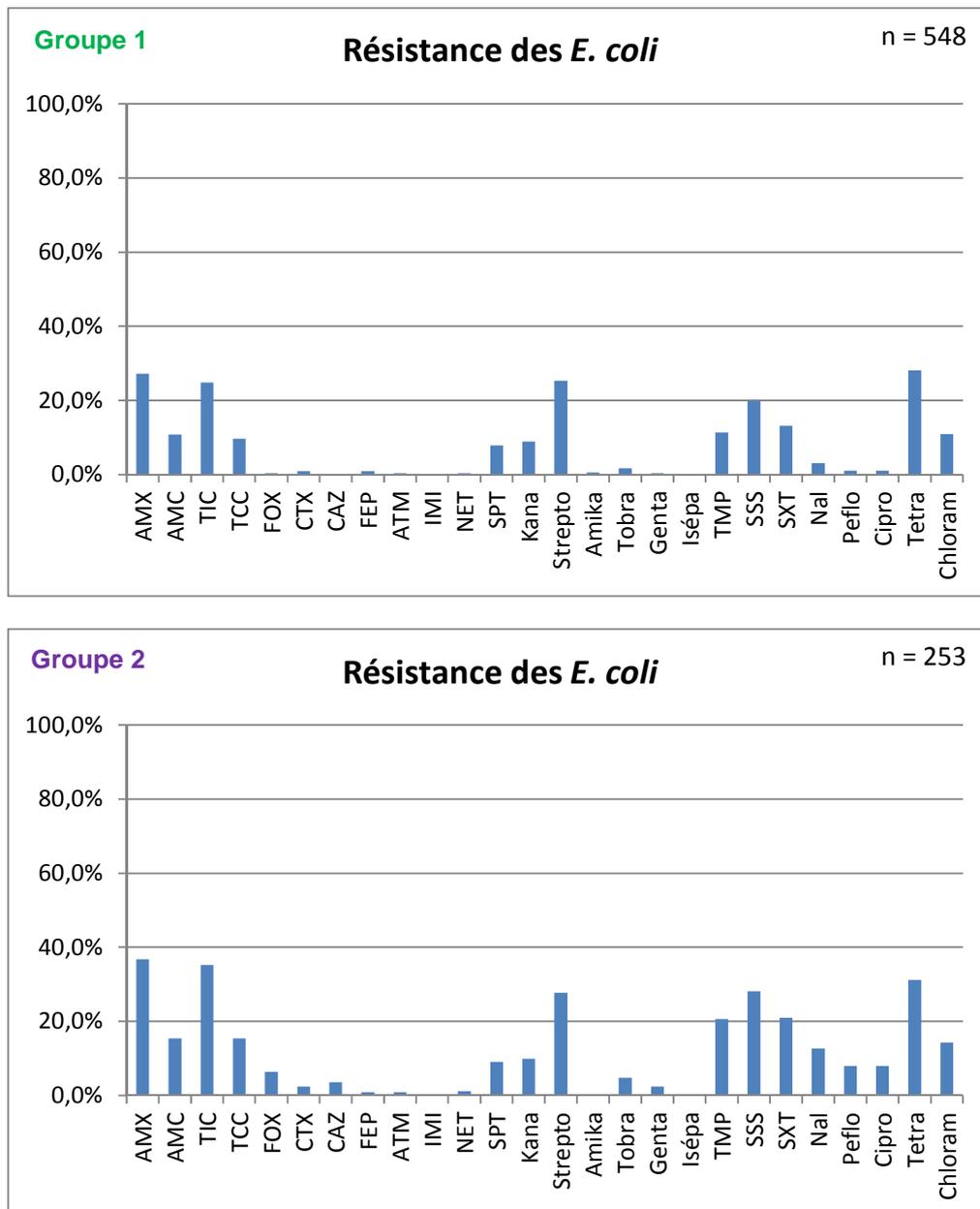


**Figure 3 :** Résistance (I+R) des entérobactéries isolées des 2 groupes vis-à-vis des antibiotiques testés.

AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline + acide clavulanique, TIC : ticarcilline, TCC : ticarcilline + acide clavulanique, FOX : céfoxitine, CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, ATM : aztréonam, IMI : imipénème, NET : nétilmicine, SPT : spectinomycine, Kana : kanamycine, Strepto : streptomycine, Amika : amikacine, Tobra : tobramycine, Genta : gentamicine, Isépa : isépamicine, TMP : triméthoprime, SSS : sulfaméthoxazole, SXT : cotrimoxazole, Nal : acide nalidixique, Peflo : péfloxacine, Cipro : ciprofloxacine, Tétra : tétracycline, Chloram : chloramphénicol.

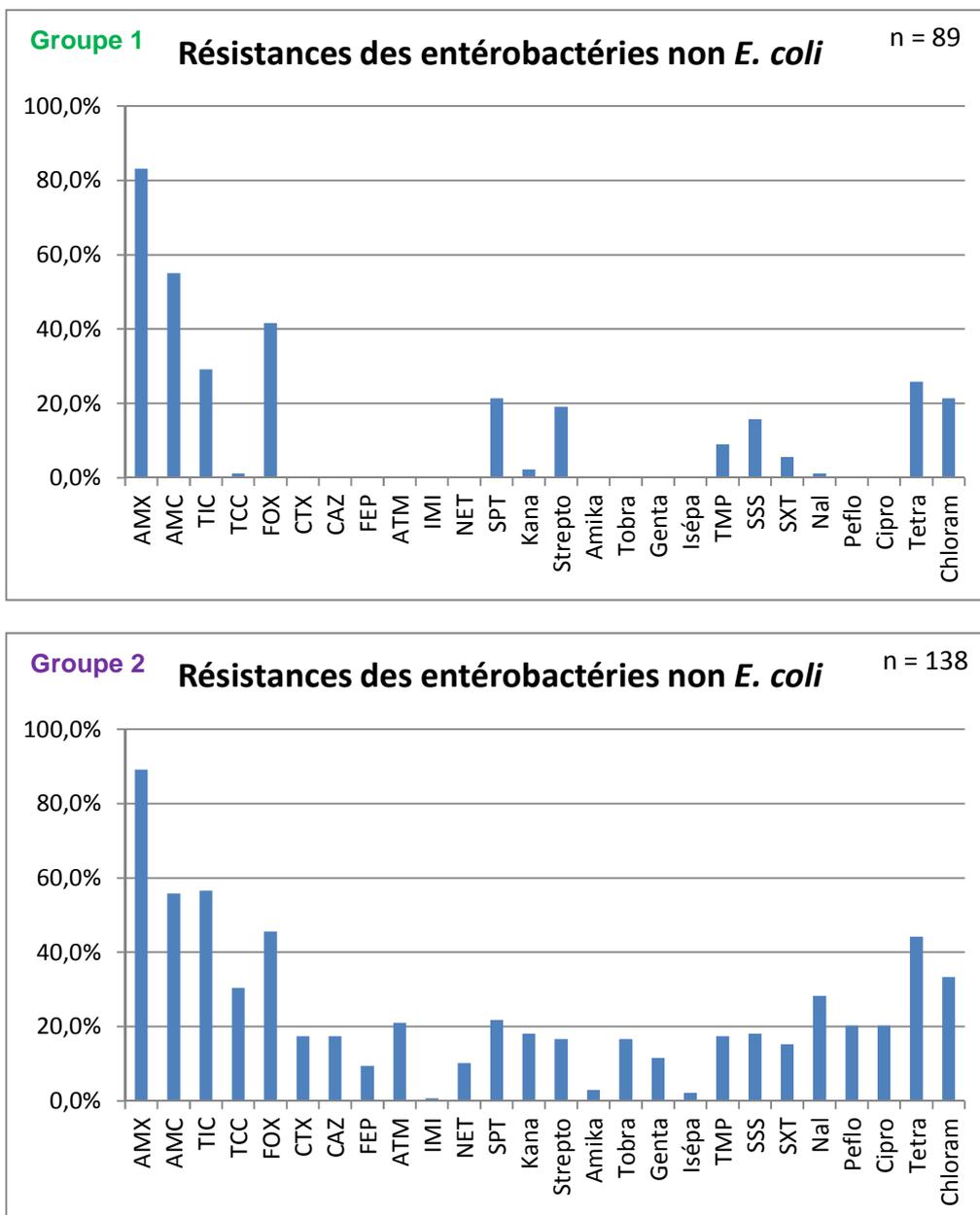
Les entérobactéries isolées des patients du **Groupe 1** étaient globalement plus sensibles aux antibiotiques que celles isolés des patients du **Groupe 2**.

Les résistances aux antibiotiques ont été analysées en séparant l'espèce *E. coli* [Figure 4] des entérobactéries non *E. coli* [Figure 5].



**Figure 4 :** Résistance (I+R) des *E. coli* isolés des 2 groupes vis-à-vis des antibiotiques testés.

Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 3.



**Figure 5 :** Résistance (I+R) des entérobactéries non *E. coli* isolés des 2 groupes vis-à-vis des antibiotiques testés. Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 3.

La différence de sensibilité aux antibiotiques constatée entre les 2 groupes s’expliquait par la plus grande résistance au sein du **Groupe 2** des bactéries appartenant à l’espèce *E. coli* [Figure 4] mais surtout par la plus grande résistance des entérobactéries non *E. coli* [Figure 5].

### 1.3.Prévalence des IR [Tableau 1]

Dans le **Groupe 1**, 12,9 % des souches hébergeaient un IR, à raison de 76 souches *intI1+* (11,7 %), 6 *intI2+* (0,9 %) et 2 *intI1+* et *intI2+* (0,3 %). Le taux d'IR était 13,2 % chez les entérobactéries et 13,9% au sein de l'espèce *E. coli*.

Dans le **Groupe 2**, 21,8 % des souches hébergeaient un IR, à raison de 85 souches *intI1+* (20,3 %) et 6 souches *intI2+* (1,4 %). Le taux d'IR était de 22,0 % chez les entérobactéries, de 22,9 % au sein de l'espèce *E. coli* et de 20,8 % au sein de l'espèce *P. aeruginosa*. Aucun IR de classe 3 n'a été détecté dans les 2 groupes.

<b>Groupe 1</b>	BGN	Entérobactéries	<i>E.coli</i>	Entérobactéries (hors <i>E.coli</i> )	Autres
<i>intI1+</i> seul	76	76	69	7	0
<i>intI2+</i> seul	6	6	5	1	0
<i>intI1+</i> , <i>intI2+</i>	2	2	2	0	0
<i>intI+</i>	84	84	76	8	0
<b>% <i>intI+</i></b>	<b>12,9%</b>	<b>13,2%</b>	<b>13,9%</b>	<b>9,0%</b>	<b>0,0%</b>
<i>intI-</i>	565	553	472	81	12
Total	649	637	548	89	12

<b>Groupe 2</b>	BGN	Entérobactéries	<i>E.coli</i>	Entérobactéries (hors <i>E.coli</i> )	<i>P. aeruginosa</i>	Autres
<i>intI1+</i> seul	85	80	56	24	5	0
<i>intI2+</i> seul	6	6	2	4	0	0
<i>intI1+</i> , <i>intI2+</i>	0	0	0	0	0	0
<i>intI+</i>	91	86	58	28	5	0
<b>% <i>intI+</i></b>	<b>21,8%</b>	<b>22,0%</b>	<b>22,9%</b>	<b>20,3%</b>	<b>20,8%</b>	<b>0,0%</b>
<i>intI-</i>	132	305	195	110	19	3
Total	418	391	253	138	24	3

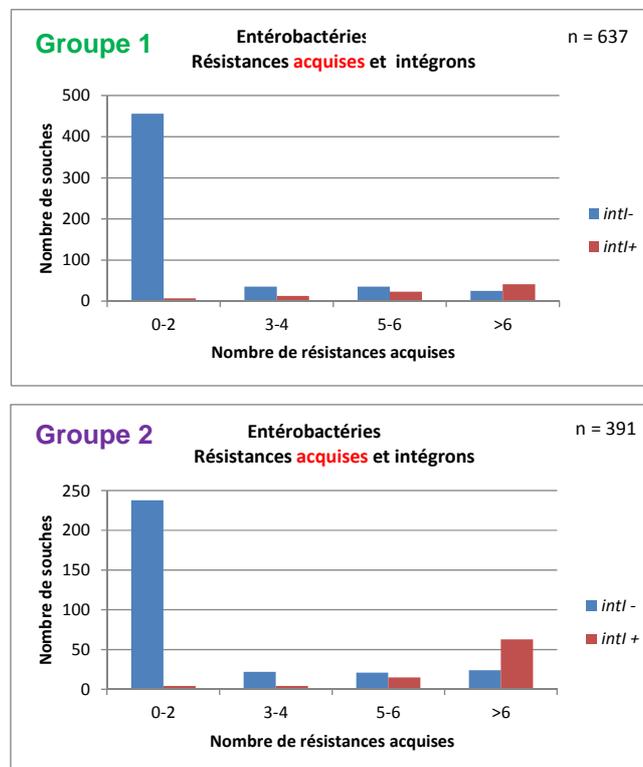
**Tableau 1** : Nombre et prévalence des IR au sein des BGN isolés des 2 groupes.

Plusieurs souches *intI+* pouvant être isolées chez un même patient, le taux de portage digestif d'IR en considérant les BGN, était de **22,8 %** dans le **Groupe 1**, soit 57 des 250 individus (dont 4 individus porteurs exclusifs d'IR de classe 2). Le portage digestif d'IR dans le **Groupe 2** était de **28,4 %**, soit 71 des 250 patients (dont 6 individus porteurs exclusifs d'IR de classe 2).

## 1.4. Résistance aux antibiotiques et lien avec les IR

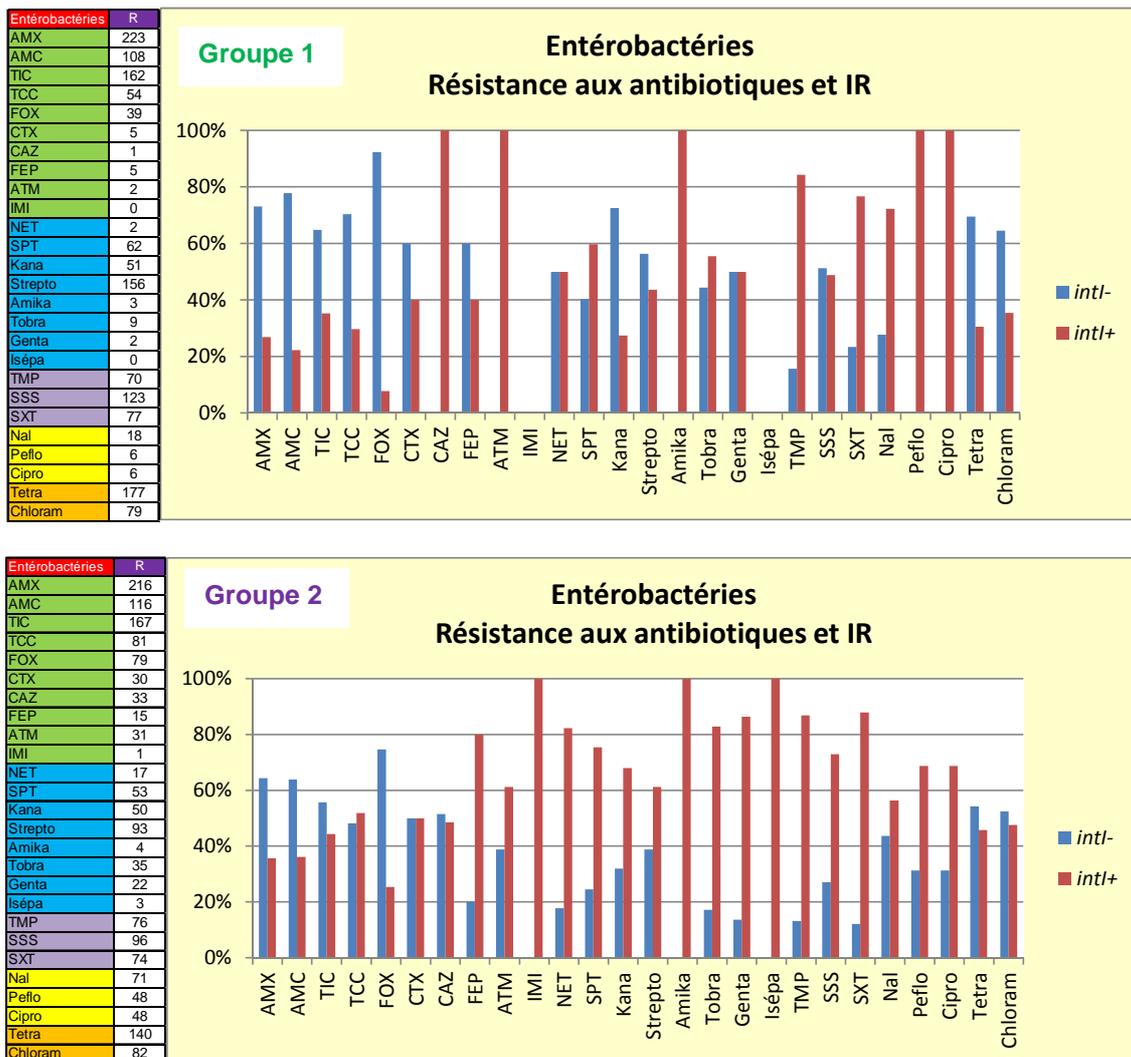
Etant donné la forte proportion d'*E. coli* dans le **Groupe 1** de personnes du service de restauration et la sensibilité naturelle de cette espèce à l'ensemble des antibiotiques testés, il nous a paru plus pertinent de s'intéresser aux résistances acquises. Ainsi, dans le **Groupe 1**, 27,3 % des souches présentaient une multirésistance acquise *versus* 38,1 % dans le **Groupe 2** de patients de réanimation.

Quel que soit le groupe, le taux de BGN *intI+* était d'autant plus important que le nombre de résistances acquises aux antibiotiques augmentait [Figure 6]. Parmi les BGN *intI-*, environ 20 % étaient multirésistants c'est-à-dire présentaient une résistance acquise à au moins 3 antibiotiques testés (17,5 % dans le **Groupe 1** et 22,0 % dans le **Groupe 2**) alors que parmi les BGN *intI+*, plus de 90 % étaient multirésistants (91,7 % dans le Groupe 1 et 95,3 % dans le Groupe 2), soit une différence significative ( $p < 0,05$ ).



**Figure 6 :** Nombre de résistances acquises et présence d'IR dans les 2 groupes.

La [Figure 7] représente la proportion de souches hébergeant un IR (*intI+*) ou n'en hébergeant pas (*intI-*) parmi les entérobactéries résistantes à chacun des antibiotiques testés.

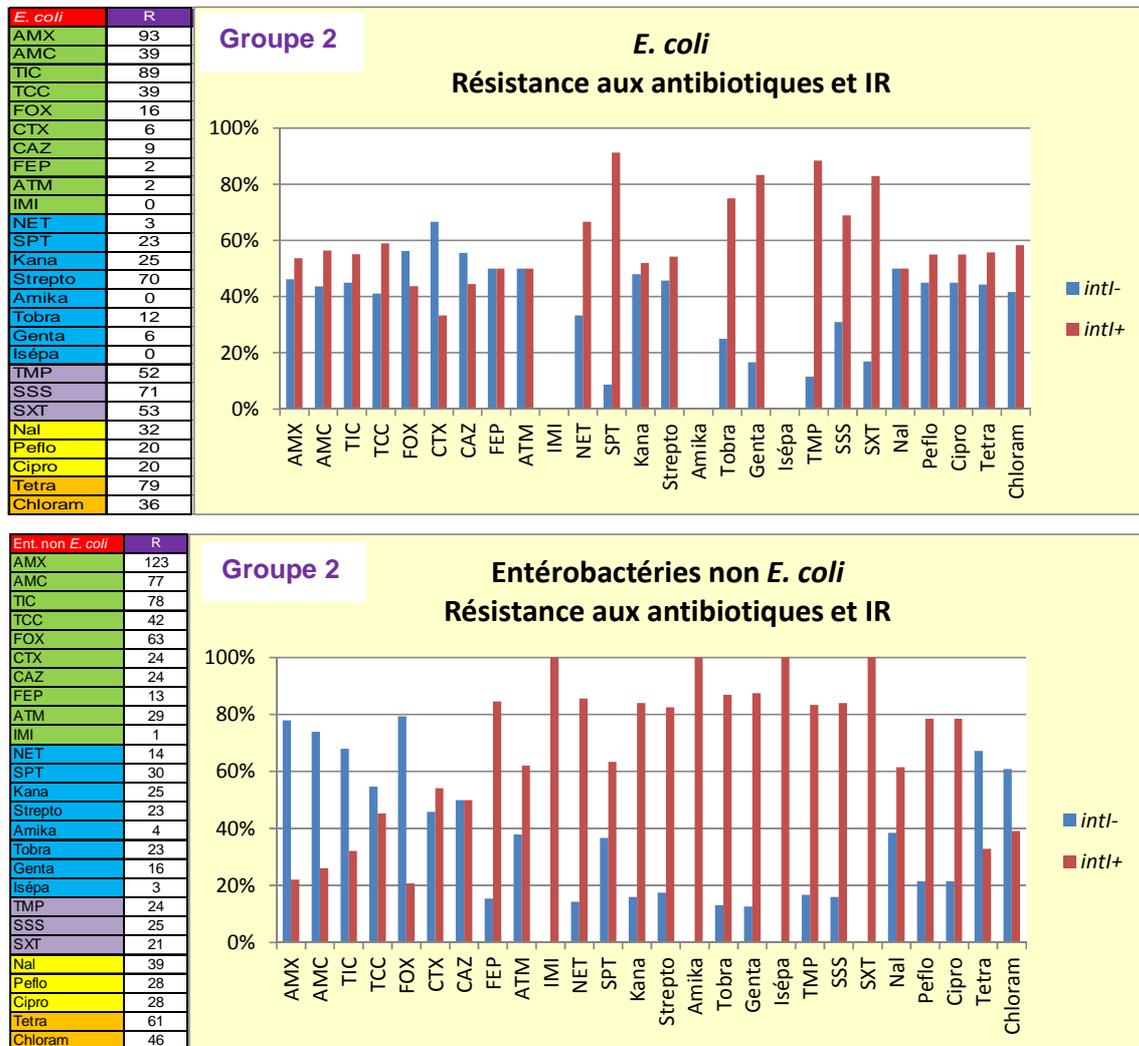


**Figure 7 :** Prévalence des IR parmi les bactéries résistantes (I+R) à tel ou tel antibiotique.

Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 3. Les tableaux à gauche des graphiques indiquent le nombre de souches résistantes pour chacun des antibiotiques testés.

Les valeurs dans le **Groupe 1** sont à prendre avec réserve étant donné le faible nombre de souches résistantes (par exemple, seules 6 souches étaient résistantes à la pefloxacin, elles hébergeaient toutes un IR, soit une valeur de 100 %...).

Au sein des bactéries du **Groupe 2** où le nombre de bactéries résistantes était suffisamment important, les résultats ont été analysés en séparant l'espèce *E. coli* des entérobactéries non *E. coli* [Figure 8].

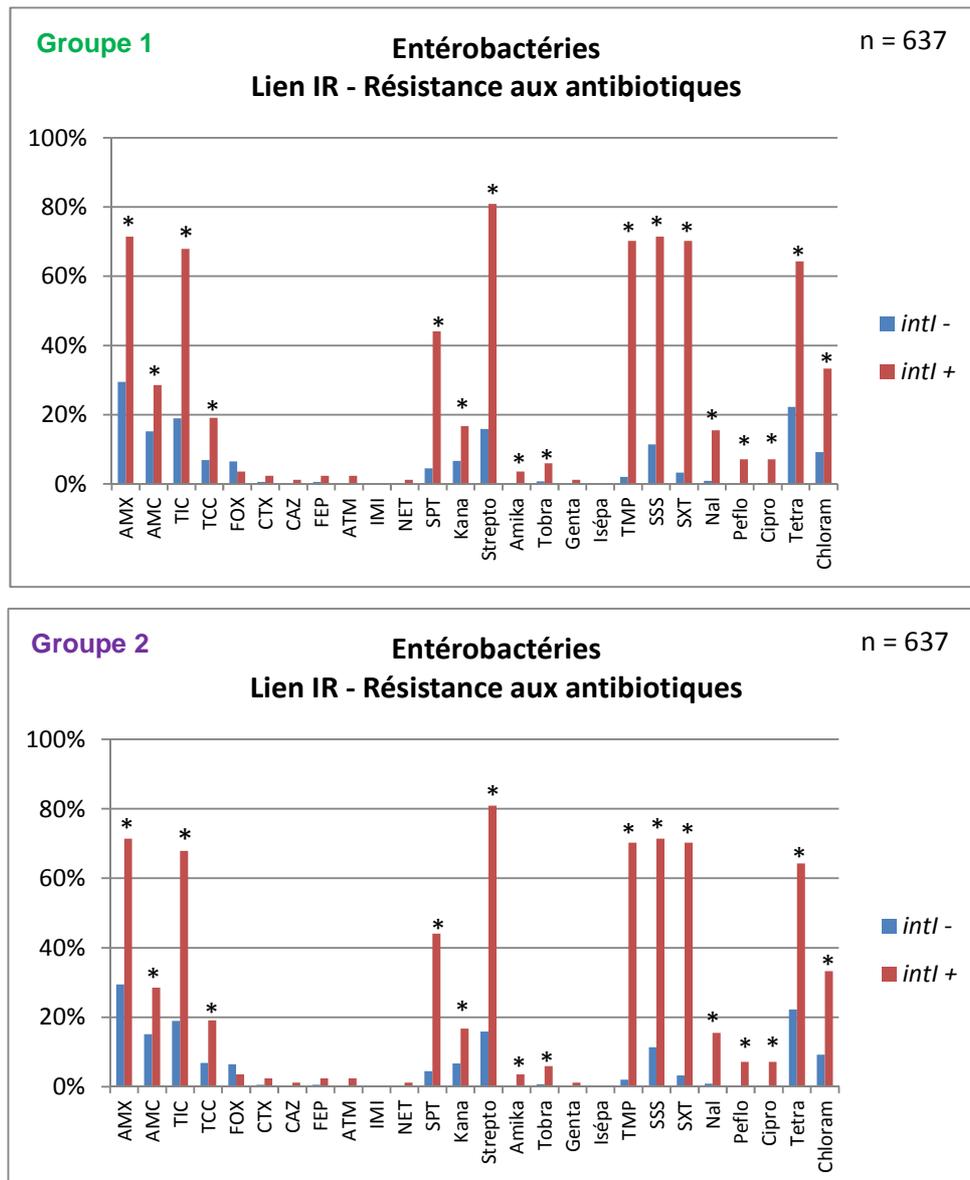


**Figure 8 :** Groupe 2 : prévalence des IR parmi les *E. coli* et les entérobactéries non *E. coli* résistantes (I+R) à tel ou tel antibiotique.

Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 3. Les tableaux à gauche des graphiques indiquent le nombre de souches résistantes pour chacun des antibiotiques testés.

Les résultats dans le **Groupe 2** montrent une association entre résistance aux aminosides et présence d'un IR. Cette relation est surtout constatée pour les entérobactéries n'appartenant pas à l'espèce *E. coli*.

Afin de pouvoir évaluer un lien statistique entre IR et antibiotiques, il est nécessaire de considérer l'ensemble des résistances ou sensibilités des entérobactéries aux antibiotiques testés avec en regard la présence ou l'absence d'IR. Ce lien est représenté dans la [Figure 9] qui indique parmi les entérobactéries qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR combien sont résistantes à tel ou tel antibiotique.

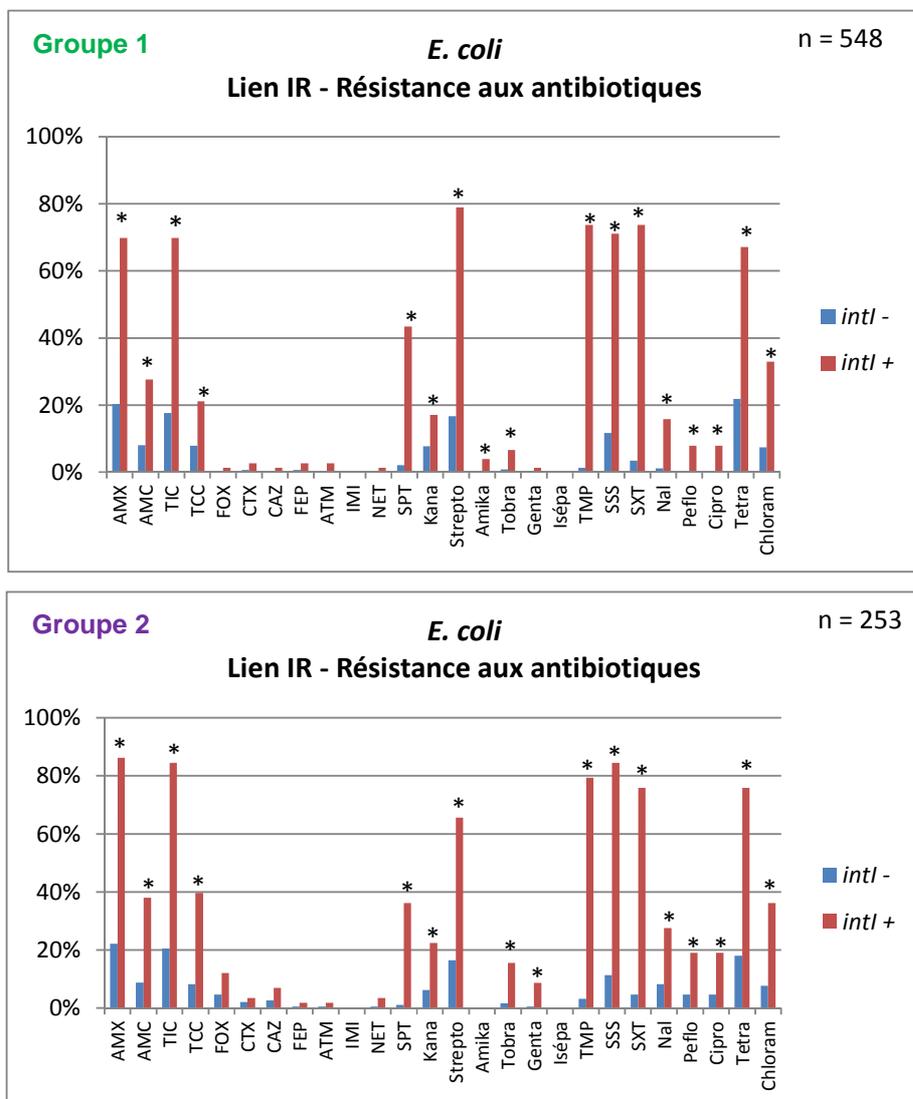


**Figure 9 :** Lien IR et résistance aux antibiotiques les entérobactéries.

Cette figure représente parmi les entérobactéries qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR, le pourcentage d'entre elles qui sont résistantes à un antibiotique donné. Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 3. L'astérisque indique un lien statistique significatif.

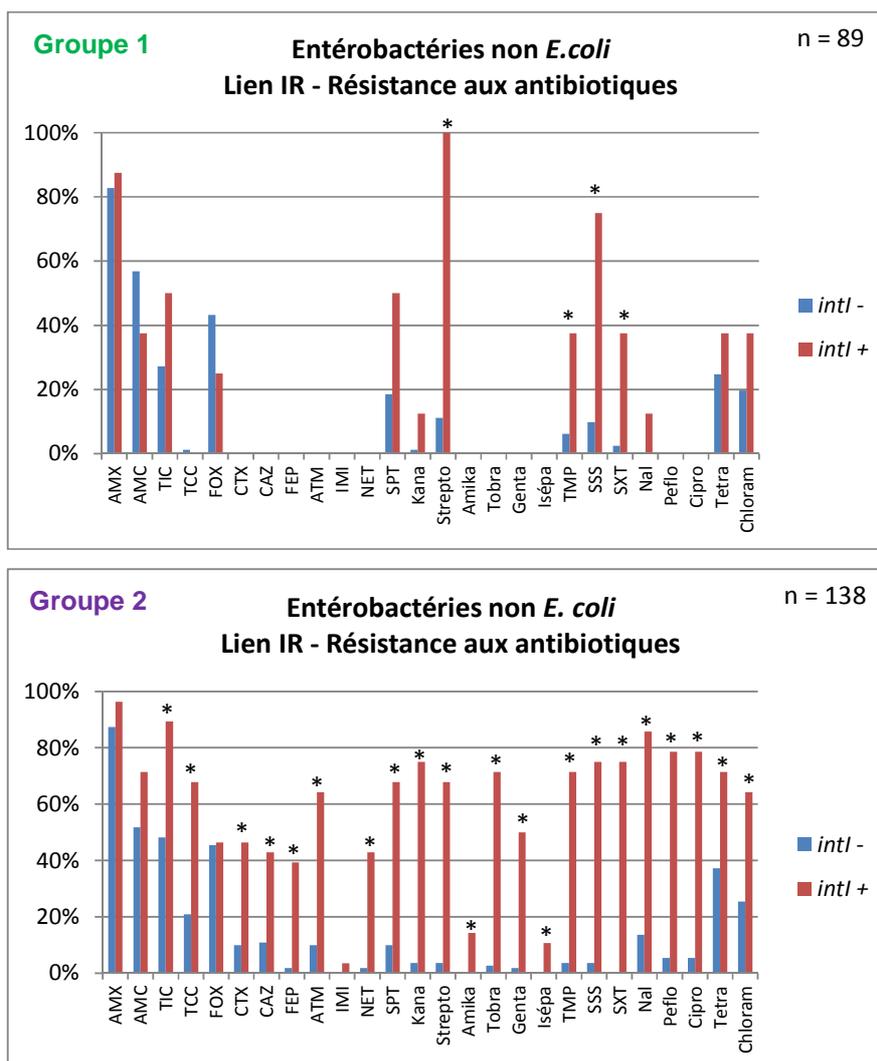
Les données montrent qu'il existe un lien statistiquement significatif entre la présence d'IR et la résistance à de nombreux antibiotiques. Le lien est particulièrement marqué pour les pénicillines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, les aminosides, le triméthoprime, le sulfaméthoxazole, la tétracycline et le chloramphénicol.

La [Figure 10] et la [Figure 11] représentent le même lien IR – antibiotique en séparant *E. coli* des entérobactéries non *E. coli*.



**Figure 10 :** Lien IR et résistance aux antibiotiques chez *E. coli*.

Cette figure représente parmi les *E. coli* qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR, le pourcentage d'entre eux qui sont résistants à un antibiotique donné. Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 3. L'astérisque indique un lien statistique significatif.



**Figure 11 :** Lien IR et résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries non *E. coli*.

Cette figure représente parmi les entérobactéries non *E. coli* qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR, le pourcentage d'entre elles qui sont résistantes à un antibiotique donné. Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 3. L'astérisque indique un lien statistique significatif. NB : Le graphique correspondant au Groupe 1 est à considérer avec prudence étant donné le très faible nombre d'entérobactéries non *E. coli* résistantes.

La distinction entre l'espèce *E. coli* et les entérobactéries non *E. coli* permet de rendre compte de certaines associations statistiques : le lien statistique observé entre la résistance des entérobactéries aux C3G et les IR n'est en réalité, dans notre étude, vrai que pour les entérobactéries non *E. coli* ; le lien entre la résistance aux pénicillines (amoxicilline et ticarcilline) n'est, dans notre étude, vrai lui que pour *E. coli*. Ceci serait à confirmer avec des effectifs plus importants de souches d'*E. coli* résistantes aux C3G.

## 2. Approche globale

### 2.1. ADN extrait du bouillon d'enrichissement

Par cette méthode, le portage digestif d'IR a été évalué à **54,8 %** dans le **Groupe 1** (137 individus), dont 44,8 % d'individus *intI1+*, 3,6 % *intI2+* et 6,4 % qui étaient porteurs des 2 classes d'IR.

Dans le **Groupe 2**, le taux de portage digestif d'IR était de **58,8 %** (147 patients), dont 48,4 % de patients *intI1+*, 2,8 % *intI2+* et 7,6 % porteurs des 2 classes d'IR.

Aucun IR de classe 3 n'a été détecté.

### 2.2. ADN extrait des selles

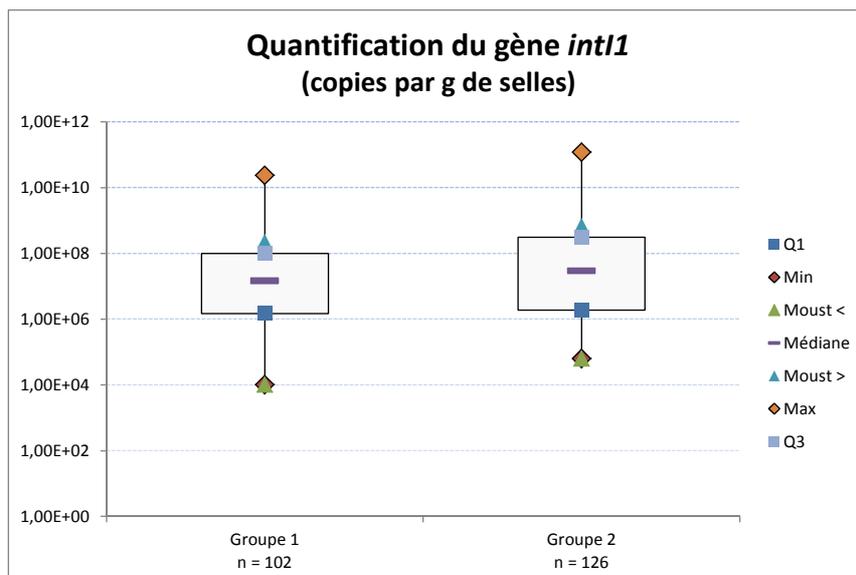
Par cette méthode, le portage digestif d'IR a été évalué à **43,6 %** dans le **Groupe 1** (109 individus), dont 37,2 % d'individus *intI1+*, 2,8 % *intI2+* et 3,6 % qui étaient porteurs des 2 classes d'IR.

Dans le **Groupe 2**, le taux de portage digestif d'IR était de **53,2 %** (133 patients), dont 46,8 % de patients *intI1+*, 2,8 % *intI2+* et 3,6 % porteurs des 2 classes d'IR.

Aucun IR de classe 3 n'a été détecté.

Parmi les patients porteurs d'IR, la quantification du gène *intI1* a montré que « l'excrétion » d'IR de classe 1 était très comparable entre les 2 groupes non seulement en ce qui concerne la médiane aux alentours de  $10^7$  copies par gramme de selle ( $1,46 \cdot 10^7$  **Groupe 1** vs  $2,93 \cdot 10^7$  dans le **Groupe 2**), mais aussi en ce qui concerne la répartition autour de cette valeur [Figure 12].

*NB : la quantification du gène *intI2* n'a pas été réalisée étant donné le faible nombre de patients porteurs dans les 2 groupes (Groupe 1, n = 16 ; Groupe 2, n = 16).*



**Figure 12 :** Représentation type « boîte à moustache » du nombre de copies du gène *int11* par gramme de selle au sein des patients porteurs d'IR de classe 1 des groupes 1 et 2.

Q1 : 1<sup>er</sup> quartile, Q3 : 3<sup>ème</sup> quartile, Min valeur minimale, Max, valeur maximale.

### 2.3. Comparaison des 2 approches globales

Les résultats obtenus entre les 2 approches globales (qPCR sur les selles et qPCR sur les bouillons d'enrichissement) pour les 2 groupes sont présentés et comparés dans le [Tableau 2].

Groupe 1		qPCR Bouillons d'enrichissement				Total général
		<i>int1</i> -	<i>int11</i>	<i>int11 int12</i>	<i>int12</i>	
qPCR Selles	<i>int1</i> -	103	32	3	3	141
	<i>int11</i>	9	80	4		93
	<i>int11 int12</i>			8	1	9
	<i>int12</i>	1		1	5	7
Total général		113	112	16	9	250

Groupe 2		qPCR Bouillons d'enrichissement				Total général
		<i>int1</i> -	<i>int11</i>	<i>int11 int12</i>	<i>int12</i>	
qPCR Selles	<i>int1</i> -	96	16	2	3	117
	<i>int11</i>	7	104	6		117
	<i>int11 int12</i>			9		9
	<i>int12</i>		1	2	4	7
Total général		103	121	19	7	250

**Tableau 2 :** Comparaison des résultats obtenus par qPCR à partir des extraits d'ADN des selles et des bouillons d'enrichissement. Les cases surlignées en jaune représentent les résultats concordants.

Il est difficile de parler de « concordance » ou « discordance » entre les 2 qPCR étant donné que les matrices ne sont pas les mêmes ; néanmoins, les résultats sont « concordants » (surlignage jaune) dans près de 80 % des cas dans le Groupe 1 et plus de 85 % des cas dans le Groupe 2.

Dans 10 à 15 % des cas, des patients ont été détectés *intI+* à partir des bouillons d'enrichissement alors qu'ils étaient *intI-* à partir des selles. L'enrichissement a permis de détecter des IR qui n'étaient pas détectables à partir des selles en raison d'une quantité initiale inférieure au seuil de détection de la qPCR.

Une dizaine de résultats « discordants » dans chacun des groupes (soit 4 % des échantillons) concernent des patients détectés *intI+* à partir des selles alors qu'ils sont détectés *intI-* à partir des bouillons d'enrichissement. Ces résultats peuvent s'expliquer par une compétition au sein du bouillon d'enrichissement qui a vu le nombre de bactéries *intI+* diminuer vis-à-vis d'autres bactéries *intI-*, les faisant passer en deçà du seuil de détection de la technique.

### **3. Analyse des résultats**

L'objectif de ce travail était d'évaluer le portage digestif en IR par des approches plus globales que la culture des BGN, tout en comparant l'impact de la pression de sélection antibiotique au sein de 2 populations différemment exposées. Le [Tableau 3] rassemble les résultats obtenus avec les 3 approches qui ont permis de déterminer le portage en IR des patients des 2 groupes.

	Approche conventionnelle Culture BGN	Approche globale	
		Bouillons d'enrichissement	Selles
<b>Groupe 1</b> (n = 250)	22,8 % (n = 57)	54,8 % (n = 137)	43,6 % (n = 109)
<b>Groupe 2</b> (n = 250)	28,4 % (n = 71)	58,8 % (n = 147)	53,2 % (n = 133)
Test du $\chi^2$	p = 0,18	p = 0,42	<b>p = 0,039</b>

**Tableau 3 :** Prévalences du portage en IR. Comparaison des résultats obtenus entre l'approche conventionnelle et les 2 approches globales. Le test statistique a comparé entre les 2 groupes les prévalences obtenues par chacune des méthodes.

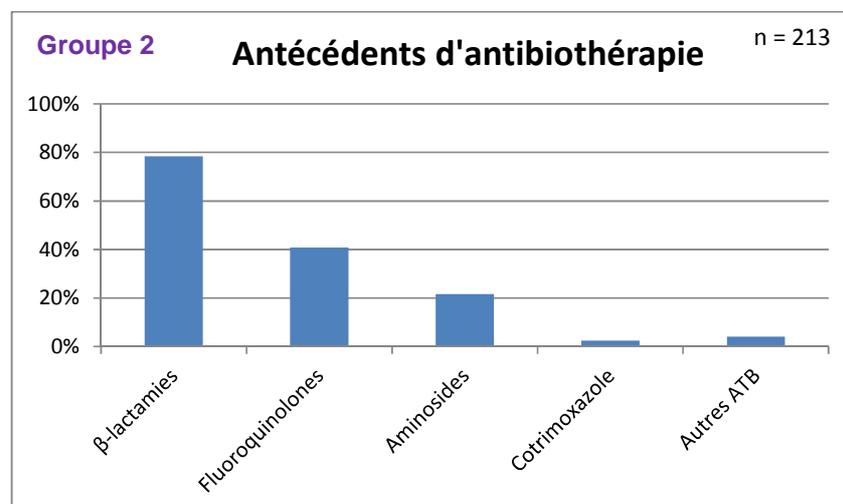
Les valeurs obtenues à partir de la culture des BGN donnent les prévalences les plus faibles qui correspondent aux chiffres classiquement retrouvés dans la littérature (15 à 30 %, cf partie bibliographique). Les valeurs se situent dans la tranche haute, mais il ne faut pas oublier qu'elles sont issues de cultures de BGN obtenues après enrichissement des selles. Par cette approche, malgré une tendance à une plus forte prévalence dans le Groupe 2, la différence entre les 2 groupes n'était pas significative (p = 0,18).

Les valeurs de prévalence issues de l'approche globale sont beaucoup plus importantes (plus de 2 fois) avec des différences par rapport à l'approche conventionnelle qui sont toutes significatives (p < 0,05), que ce soit à partir des bouillons d'enrichissement ou des selles. Ces données peuvent s'expliquer par plusieurs hypothèses : (i) certains BGN *intI+* n'ont pas été isolés à la culture, (ii) certains BGN n'ont pu croître sur gélose Drigalski en raison d'une compétition avec d'autres BGN plus nombreux (iii) d'autres bactéries telles que les bactéries à Gram + ou les anaérobies qui n'ont pas été recherchés hébergeaient des IR, (iv) des bactéries dites viables non cultivables impossibles à mettre en évidence peuvent héberger des IR.

Quoi qu'il en soit, l'approche globale permet de rendre compte d'une prévalence en IR sûrement plus juste que celle issue des données de l'approche conventionnelle. Si l'on se base sur les valeurs issues des extraits d'ADN de selles, qui sont les valeurs les plus représentatives des quantités réelles d'IR présentes dans le tube digestif, Les patients du **Groupe 2** hébergeaient plus d'IR que ceux du **Groupe 1** ( $p = 0,035$ ).

Les données concernant l'antibiothérapie dans les 3 mois précédant le recueil de selles ont montré que parmi les sujets du **Groupe 1**, 6,8 % avaient pris une antibiothérapie (soit 17 patients) ; ce pourcentage était de 84,8 % (soit 213 patients) parmi les patients du **Groupe 2**. La majorité des patients du **Groupe 2** avaient bénéficié d'une double ou triple antibiothérapie avec l'emploi dans près de 80 % des cas de  $\beta$ -lactamines et dans 40 % des cas de fluoroquinolones [Figure 13].

A noter que parmi les patients du **Groupe 2** qui n'avaient pas d'antécédents de prise d'antibiotique ( $n = 37$ ), 65 % étaient porteurs d'IR, alors que parmi ceux qui avaient des antécédents ( $n = 213$ ), 52 % étaient porteurs d'IR.



**Figure 13 :** Répartition en pourcentage des familles d'antibiotiques administrés aux patients du Groupe 2.

## **Partie 4 :**

**Protocole « Hemotion » :**

**Evaluation de la valeur prédictive du marqueur  
intégron recherché à partir de flacons  
d'hémocultures positifs à bacilles à BGN**

Des pathologies sévères telles que le Sepsis nécessitent une rapidité de prise en charge et une antibiothérapie probabiliste adaptée qui conditionne la probabilité de survie du patient. Les techniques conventionnelles de bactériologie ne répondent pas à cette exigence: en effet, il faut 36 à 48 heures pour disposer de l'antibiogramme de la bactérie responsable de l'infection, imposant au clinicien d'instaurer une antibiothérapie probabiliste, choisie en fonction d'éléments d'orientation clinique et de données épidémiologiques. L'émergence actuelle de bactéries multirésistantes (BMR) aussi bien en ville qu'à l'hôpital vient compliquer ce choix thérapeutique. Des techniques de biologie moléculaire concernant la détection de la résistance aux antibiotiques ont récemment été mises au point mais s'intéressent principalement à des déterminants impliquées dans la résistance des bactéries à Gram positif. Chez les BGN, des centaines de gènes de résistance ont été décrits, rendant difficile une détection génotypique aisément réalisable en routine ; les techniques génotypiques existantes ne sont pas pour l'instant utilisables à partir de prélèvements cliniques. Il nous est apparu pertinent de rechercher un marqueur de résistance plus global retrouvé chez les BGN. Un lien entre IR et multirésistance aux antibiotiques a été montré par plusieurs études épidémiologiques (voir Chapitre 1).

L'objectif principal du protocole « Hemotion » était de déterminer si les IR pouvaient constituer un marqueur prédictif (positif ou négatif) d'acquisition de résistance aux antibiotiques chez les BGN. L'objectif secondaire était de savoir si la technique de qPCR développée au laboratoire permettait de détecter directement à partir de flacons d'hémocultures positifs à BGN la présence des 3 principales classes d'IR, avant même les résultats de la culture bactérienne et de l'antibiogramme.

Deux cents cinq (205) flacons d'hémocultures correspondants à 205 patients ont été inclus dans le protocole Hemotion, soit un total de 235 BGN dont 81,7 % d'entérobactéries. Seuls des IR de classe 1 et 2 ont été détectés pour une prévalence au sein des patients de 25,9 % ; aucun IR de classe 3 n'a été mis en évidence. Les résultats de la détection des IR à partir des flacons d'hémoculture étaient concordants avec ceux obtenus à partir des BGN dans 98,5 % des cas.

Au sein des entérobactéries, le lien entre IR et multirésistance acquise aux antibiotiques a été montré, avec une significativité pour la plupart des antibiotiques utilisés en pratique clinique : pénicillines, aminosides, fluoroquinolones, cotrimoxazole. La distinction entre l'espèce *E. coli* et les autres entérobactéries a permis de montrer que ce lien n'était pas exactement le même : les résistances aux C3G et aux aminosides n'étaient ainsi liées statistiquement qu'aux entérobactéries non *E. coli*. Le lien entre IR et résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines était dû chez *E. coli* au phénotype pénicillinase alors qu'il était dû au phénotype BLSE chez les autres entérobactéries. Excepté pour les phénotypes pénicillinase haut niveau et céphalosporinase déréprimée, les liens entre IR et les différents phénotypes de résistance acquis étaient tous significatifs, notamment en ce qui concerne la résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines et aux fluoroquinolones.

L'étude a montré que le marqueur IR présentait de très bonnes valeurs prédictives négatives (VPN) en ce qui concerne la résistance aux antibiotiques : 93,5 % vis-à-vis des aminosides, 91,4 % vis-à-vis de la ciprofloxacine, 97,8 % vis-à-vis du cotrimoxazole, et plus de 92 % vis-à-vis des C3G (97 % pour l'espèce *E. coli*). Les VPN pour une résistance acquise de type pénicillinase de haut niveau, céphalosporinase de haut niveau et BLSE étaient respectivement de 95,7 %, 93,5 % et 99,3 %.

## Matériels et Méthodes :

### *Prélèvements*

Au sein du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU Limoges, de mars à août 2010, tous les flacons d'hémoculture aérobie et/ou anaérobie détectés positifs par l'appareil d'hémoculture BactAlert<sup>®</sup> 3D (bioMérieux) et pour lesquels des BGN étaient observées à la coloration de Gram, ont été inclus dans le protocole.

Lorsque, pour un même patient, plusieurs flacons d'hémoculture étaient positifs avec des BGN, les identifications et antibiogrammes n'étaient réalisés que sur un seul flacon, sous réserve que les cultures des différents flacons étaient concordantes.

### *Culture bactérienne, identification et antibiogramme*

Les flacons d'hémoculture positifs à BGN étaient pris en charge en routine selon les bonnes pratiques de laboratoire. Chaque flacon d'hémoculture positif à BGN était repiqué sur gélose Columbia au sang, une gélose chocolat et une gélose Cled. Pour les flacons aérobies, l'identification et l'antibiogramme étaient réalisés avec le système Vitek<sup>®</sup> (bioMérieux) ; pour les flacons anaérobies contenant du charbon, un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé sur milieu Muller-Hinton était réalisé selon les recommandations du CA-SFM, avec un panel d'antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique. Les antibiotiques testés communs aux deux techniques et pour lesquels une analyse a été menée étaient au nombre de 16, répartis en 4 familles : (i)  **$\beta$ -lactamines** : amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline, pipéracilline + tazobactam, céfalotine, céfoxitine, céfotaxime, ceftazidime, imipénème ; (ii) **aminosides** : gentamicine, tobramycine, nétilmicine, amikacine ; (iii) **quinolones** :

acide nalidixique, ciprofloxacine, (iv) **cotrimoxazole**. Dans l'analyse des résultats, les souches intermédiaires (I) et résistantes (R) ont été agrégées (I+R).

### *Détection des IR par qPCR*

#### *- à partir des flacons d'hémoculture*

La détection des IR par la qPCR a été réalisée directement à partir d'une dilution au 1/100<sup>ème</sup> du flacon d'hémoculture positif, sans centrifugation préalable, aussi bien pour les flacons aérobies que pour les flacons anaérobies : 100 µL de prélèvement étaient dilués dans 900 µL d'eau stérile, puis une nouvelle dilution de 100 µL dans 900 µL d'eau stérile étaient réalisées. La qPCR de détection des IR a été faite à partir de 5 µL de cette deuxième suspension en utilisant l'automate Smart Cyclyer II V2.0 (Cepheid®).

#### *- à partir des BGN*

La détection des IR à partir des BGN était considérée comme le « gold standard ». Elle a été réalisée à partir de 5 µL d'une suspension visuellement trouble de quelques colonies bactériennes mises en eau stérile.

### *Lien IR et résistance aux antibiotiques*

En raison des effectifs, l'étude du lien entre présence d'IR et résistance aux antibiotiques n'a été effectuée que sur les souches d'entérobactéries. Pour chaque paramètre, les résultats ont concerné l'ensemble des entérobactéries, ainsi que l'espèce *E. coli* et les « entérobactéries non *E. coli* ». La multirésistance a été définie comme la résistance acquise à au moins 3 antibiotiques testés. Les liens entre IR et résistances aux antibiotiques ont été déterminés en employant le test statistique du chi2 ( $\chi^2$ ). Un test exact de Fisher a été utilisé lorsque les effectifs étaient inférieurs à 5.

## Résultats :

Au total, **205 patients** ont été inclus dans le protocole « Hemotion ».

### 1. Hémocultures

Sur les 205 patients, 158 hémocultures étaient mono-bactériennes, 47 étaient positives à au moins deux germes [Tableau 1].

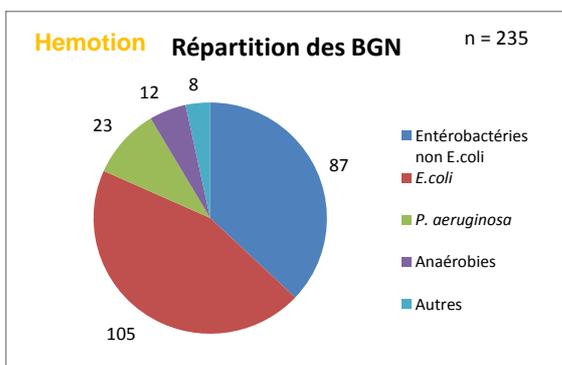
Culture monomicrobienne n = 158	Entérobactéries	Non entérobactéries pyo, Acineto, Haemophilus...	Anaérobies		
	124	23	11		
culture polymicrobienne n = 47	≥ 2 entérobactéries	Entérobactérie + Gram +	Entérobactérie + Anaérobie	Entérobactérie + non entérobactérie	Autres cas
	18 dont 1 HC avec 3 entérobac et 1 HC avec 4 entérobac	17 dont 2 HC avec 2 entérobac + Gram +	4	3 dont 1 HC avec 2 entéro + 1 non entéro	8

**Tableau 1 :** Répartition des cultures issues des hémocultures (HC) du protocole « Hemotion ».

Les « autres cas » rassemblent les cultures à BGN non entérobactéries ou l'association entérobactéries et levures.

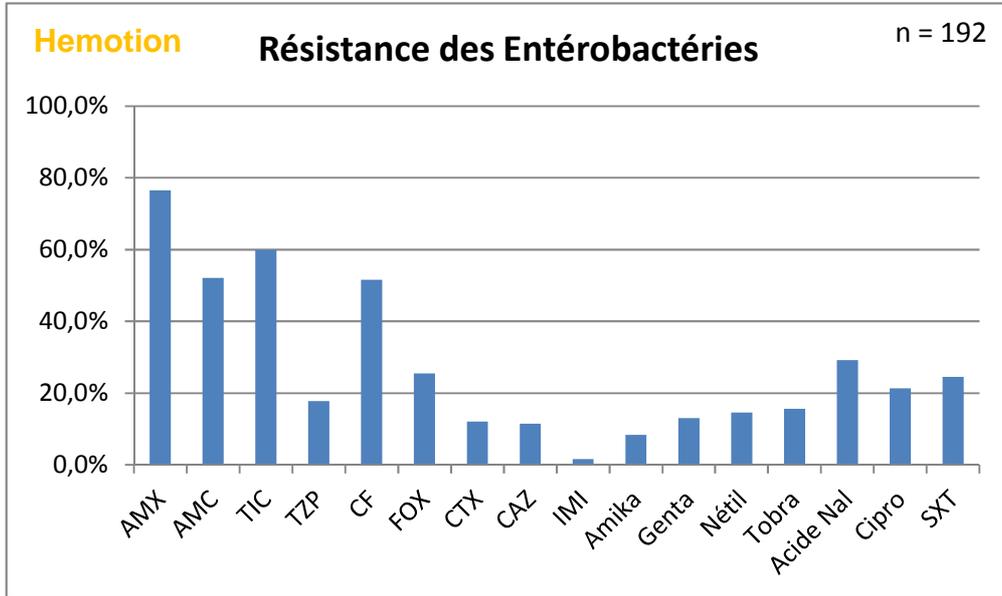
### 2. Les souches bactériennes [Figure 1]

Le nombre d'isolats bactériens était de 259 (soit 1,26 par patient), dont 235 BGN. Parmi les BGN, 81,7 % appartenait à la famille des entérobactéries (n=192), 44,7 % à l'espèce *E. coli* (n = 105).



**Figure 1 :** Protocole « Hemotion » : Nombre et répartition des BGN isolés.

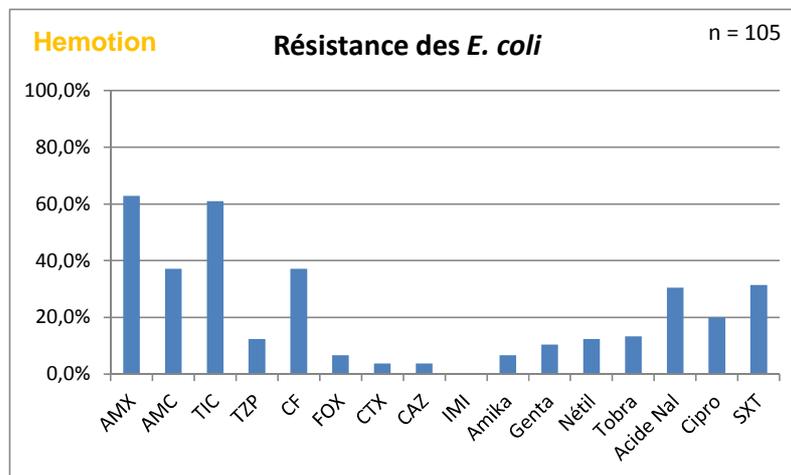
Les pourcentages de résistances des BGN aux antibiotiques n'ont été déterminés que pour les 192 **entérobactéries**, ils sont présentés dans la [Figure 2].

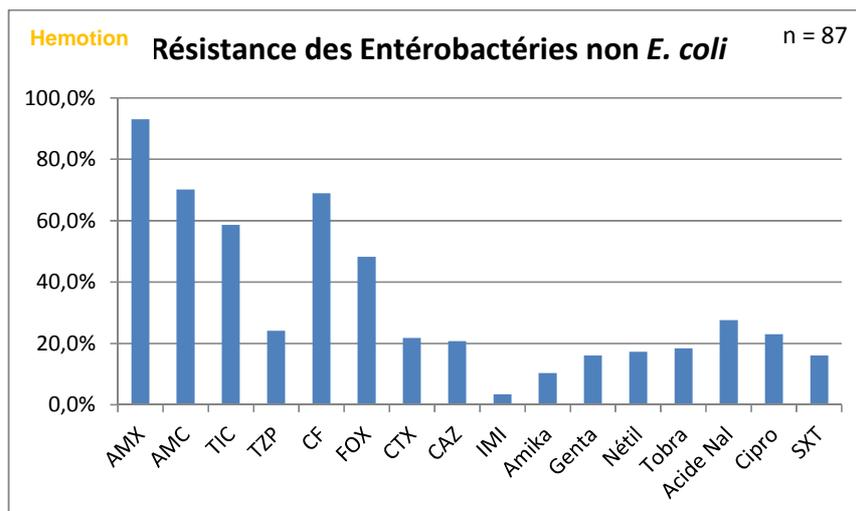


**Figure 2 :** Pourcentage de résistance (I+R) par antibiotique des entérobactéries isolées.

AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline + acide clavulanique, TIC : ticarcilline, TZP : pipéracilline + tazobactam, CF : céfalotine, FOX : céfoxitine, CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, IMI : imipénème, Amika : amikacine, Genta : gentamicine, Nétil : nétilmicine, Tobra : tobramycine, Acide Nal : acide nalidixique, Cipro : ciprofloxacine, SXT : cotrimoxazole (triméthoprime + sulfaméthoxazole).

Une représentation comparable a également été réalisée pour les *E. coli* et les entérobactéries non *E. coli* [Figure 3].





**Figure 3 :** Pourcentage de résistance (I+R) par antibiotique des *E. coli* et entérobactéries non *E. coli*.  
Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 2.

### 3. Détection des IR

#### 3.1. A partir des BGN

53 des 205 patients hébergeaient dans leurs hémocultures au moins 1 BGN *intI+* (classe 1 et/ou classe 2, aucun IR de classe 3 n'a été détecté), soit une prévalence au sein des patients de **25,9 %**.

Concernant les BGN, 57 hébergeaient un IR, soit une prévalence de **24,3 %**, à raison de 50 BGN *intI1+* (21,3 %), 4 *intI2+* (1,7 %) et 3 *intI1+/intI2+* (1,3 %). Au sein des entérobactéries, cette prévalence était de 27,6% (36,2 % au sein de l'espèce *E. coli*) ; 17,4 % des isolats de *P. aeruginosa* hébergeaient un IR [Tableau 2].

Hemotion	BGN	Entérobactéries	Entérobactéries non <i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Anaérobies	Autres BGN
<i>intI1+</i> seul	50	46	13	33	4	0	0
<i>intI2+</i> seul	4	4	1	3	0	0	0
<i>intI1+, intI2+</i>	3	3	1	2	0	0	0
<i>intI+</i>	57	53	15	38	4	0	0
<b>% <i>intI+</i></b>	<b>24,3%</b>	<b>27,6%</b>	<b>17,2%</b>	<b>36,2%</b>	<b>17,4%</b>	<b>0,0%</b>	<b>0,0%</b>
<i>intI-</i>	178	139	72	67	19	12	8
Total	235	192	87	105	23	12	8

**Tableau 2 :** Répartition des IR (classe 1 et 2) au sein des BGN.

### 3.2.A partir des flacons d'hémoculture

Les résultats ont été concordants avec la détection des IR à partir des BGN dans 98,5 % des cas [Tableau 3].

		Triplex qPCR Hémocultures (HC) n =205			
Isolement d'1 BGN		<i>int1</i> +	<i>int2</i> +	<i>int1</i> +, <i>int2</i> +	<i>int1</i> -
	<i>int1</i> +	49			2
	<i>int2</i> +		7		
	<i>int1</i> +, <i>int2</i> +			3	
	<i>int1</i> -	1			143

4 BGN isolés *int1*- → HC réensemencée : isolement d'un 5<sup>ème</sup> BGN *int1*+

Présence d'inhibiteurs ? → extraction ADN +++

**Tableau 3 :** Tableau de concordance qPCR sur flacons d'hémoculture / qPCR sur BGN correspondants.

Deux types de discordances ont été retrouvés pour 3 échantillons (1,5 % des cas) :

- qPCR *int1*+ à partir d'un flacon, qPCR *int1*- à partir des BGN isolés (1 cas).

La remise en culture du flacon a permis de mettre en évidence un 5<sup>ème</sup> BGN porteur d'IR qui n'avait pas été isolé initialement.

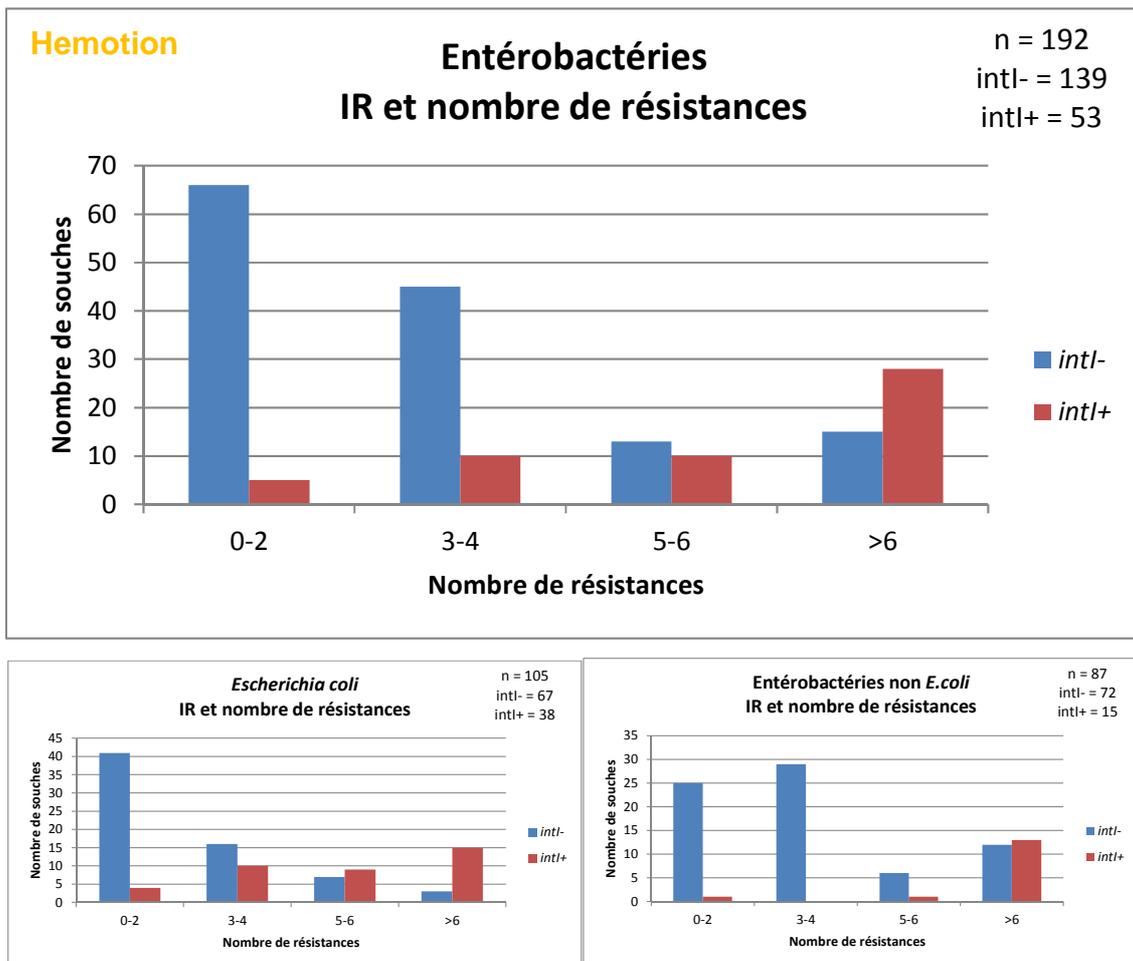
- qPCR *int1*- à partir d'un flacon, qPCR *int1*+ à partir des BGN isolés (2 cas).

Cette discordance s'explique par la présence d'inhibiteurs de PCR dans le flacon d'hémoculture.

## 4. Lien IR et résistance aux antibiotiques

### 4.1. IR et nombre de résistances naturelles et acquises confondues

Les résistances vis-à-vis des 16 antibiotiques testés ont été regroupées en 3 groupes : 0 à 2, 3 à 4, 5 à 6 et supérieur à 6 antibiotiques [Figure 4].



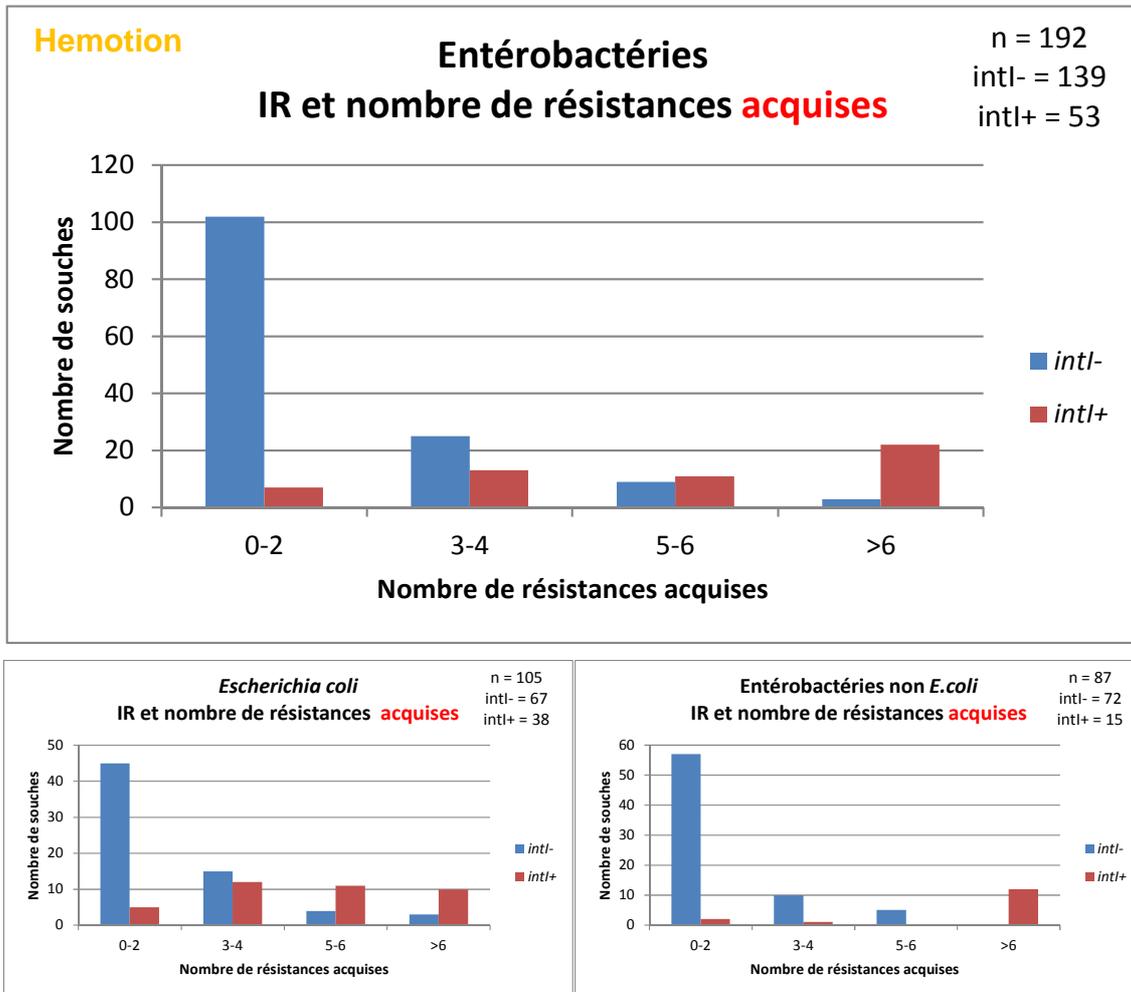
**Figure 4 :** IR et nombre de résistances (entérobactéries, *E. coli* et entérobactéries non *E. coli*).

*NB : Les échelles ne sont pas les mêmes entre les 3 diagrammes.*

Globalement, plus le nombre de résistances était important, plus le nombre de souches hébergeant un IR était important ; ces chiffres sont à pondérer en raison des nombreuses résistances naturelles chez les entérobactéries non *E. coli*.

## 4.2.IR et nombre de résistances acquises

Les résistances **acquises** vis-à-vis des 16 antibiotiques testés ont été séparés en 3 groupes : 0 à 2, 3 à 4, 5 à 6 et supérieur à 6 antibiotiques [Figure 5].



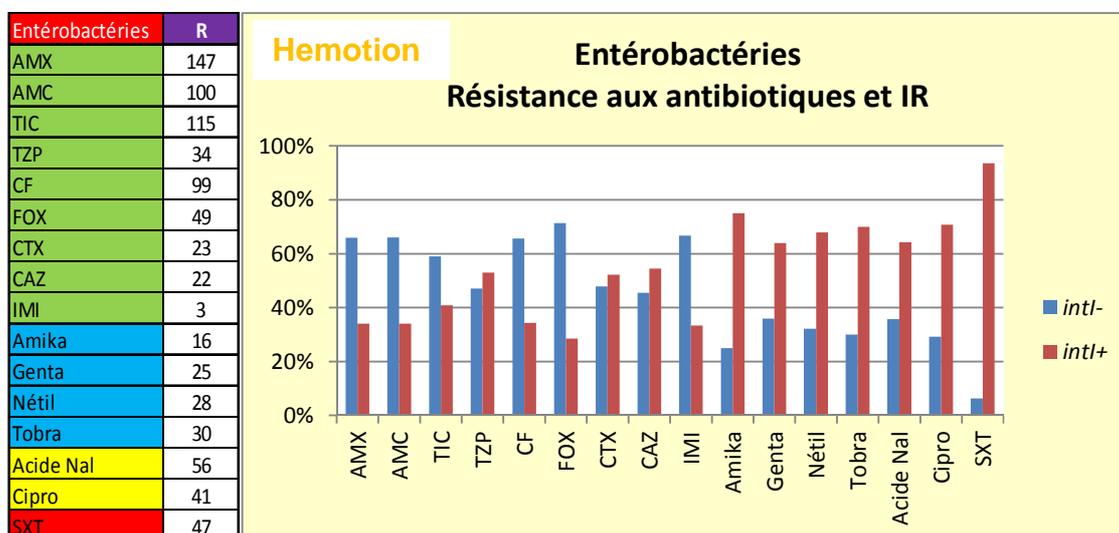
**Figure 5 :** IR et nombre de résistances **acquises** (entérobactéries, *E. coli* et entérobactéries non *E. coli*).

*NB :* Les échelles ne sont pas les mêmes entre les 3 diagrammes.

Parmi les entérobactéries *intI-*, 26,6 % présentait une résistance acquise à au moins 3 antibiotiques (32,8 % pour *E. coli*, 20,8 % pour les non *E. coli*) ; parmi les entérobactéries *intI+*, 86,8 % était multirésistante (valeurs identiques pour *E. coli* et non *E. coli*), soit une différence significative ( $p < 0,05$ ). A noter que toutes les entérobactéries non *E. coli* avec plus de 6 résistances acquises hébergeaient un IR.

### 4.3.Lien IR et résistance par antibiotique

Afin de mettre en évidence le lien IR – résistance pour chacun des antibiotiques testés, la [Figure 6] montre parmi les entérobactéries résistantes à tel ou tel antibiotique, combien sont IR+ et combien sont IR-. Les résultats sont présentés en pourcentage (somme des pourcentages *intI+* et *intI-* égale à 100 %). Pour chaque antibiotique, le dénominateur est différent car on ne considère pour cet antibiotique que les souches I/R.

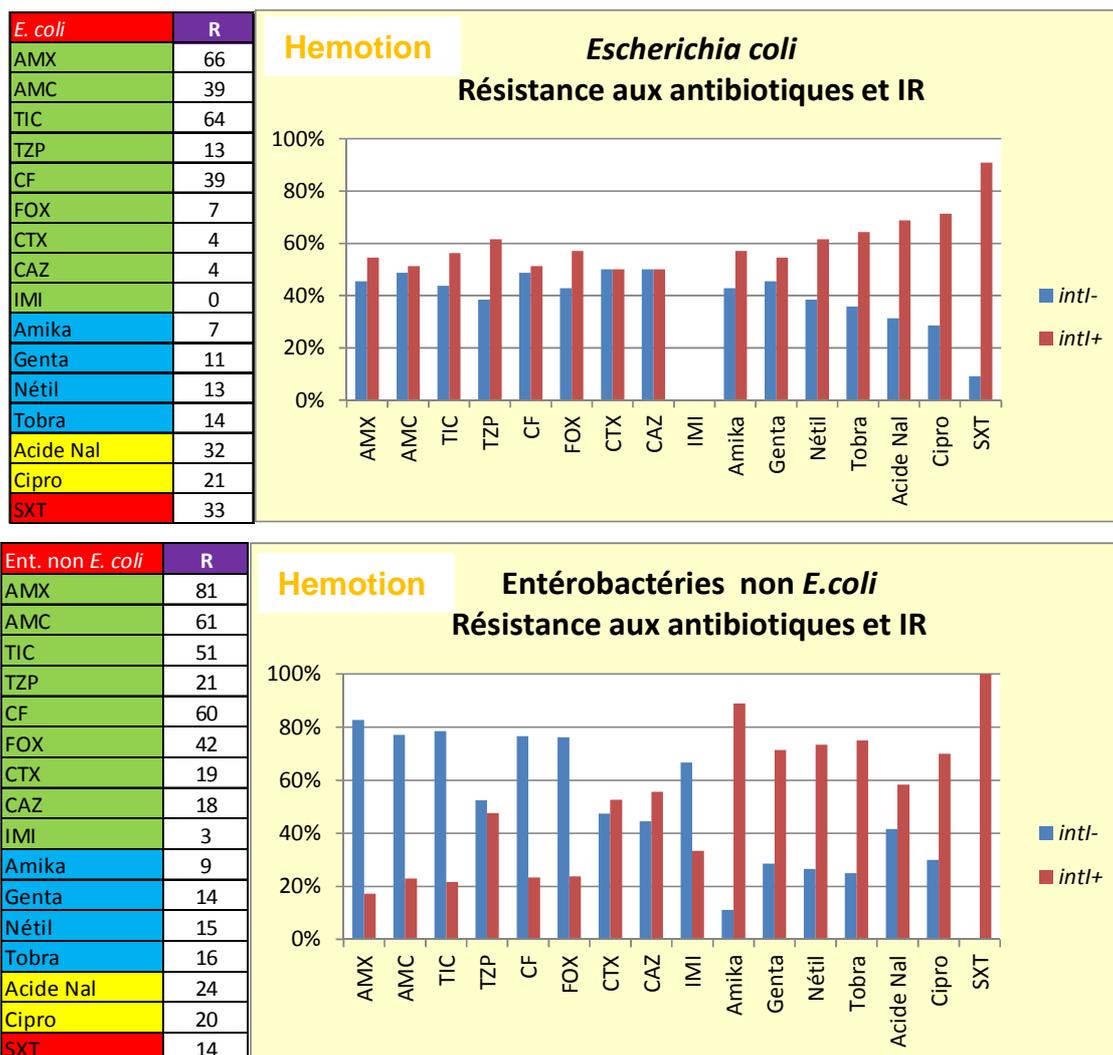


**Figure 6 :** Lien IR – résistance par antibiotique chez les entérobactéries.

La lecture du graphique doit être faite de la façon suivante : « parmi les souches I/R à tel antibiotique, x % hébergent un IR ». Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 2. Les tableaux à gauche des graphiques indiquent le nombre de souches résistantes pour chacun des antibiotiques testés.

Les souches résistantes au cotrimoxazole hébergeaient dans 93,6 % des cas un IR. Parmi les entérobactéries résistantes aux aminosides, 60 à 70 % hébergeaient un IR. Parmi les entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine, 70 % hébergeaient un IR.

Le lien IR – résistance pour chacun des antibiotiques testés a également été déterminé pour les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* et pour les entérobactéries non *E. coli* [Figure 7].

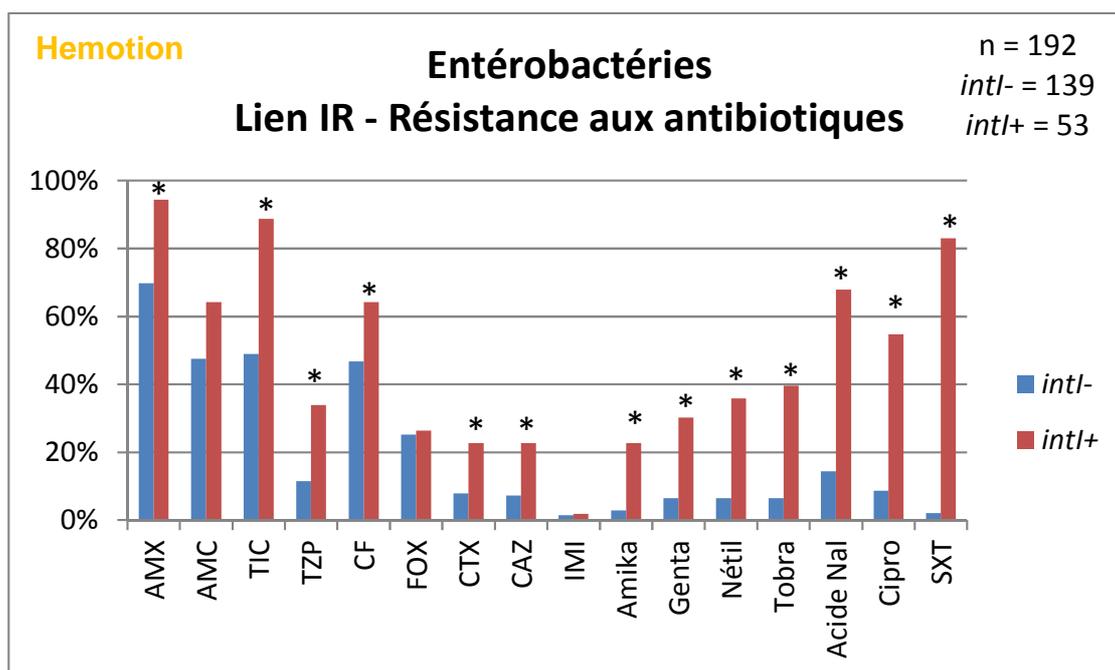


**Figure 7 :** Lien IR – résistance par antibiotique chez l’espèce *E. coli* et les entérobactéries non *E. coli*.

La lecture du graphique doit être faite de la façon suivante : « parmi les souches I/R à tel antibiotique, x % hébergent un IR ». Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 2 Les tableaux à gauche des graphiques indiquent le nombre de souches résistantes pour chacun des antibiotiques testés.

Le lien IR – résistance aux  $\beta$ -lactamines est peu marqué pour l’espèce *E. coli*, il est plus marqué vis-à-vis des fluoroquinolones (71,4 % des souches résistantes à la ciprofloxacine hébergent un IR) et du cotrimoxazole (90,9 %). Le lien IR – résistance aux antibiotiques est surtout marqué pour les entérobactéries non *E. coli*, notamment avec les aminosides (88,9 % de souches résistantes à l’amikacine hébergent un IR) et surtout le cotrimoxazole (lien égal à 100 %).

Afin de pouvoir évaluer un lien statistique entre IR et antibiotiques, il est nécessaire de considérer l'ensemble des résistances ou sensibilités des entérobactéries aux antibiotiques testés avec en regard la présence ou l'absence d'IR. Ce lien est représenté dans la [Figure 8] qui indique parmi les entérobactéries qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR combien sont résistantes à tel ou tel antibiotique.

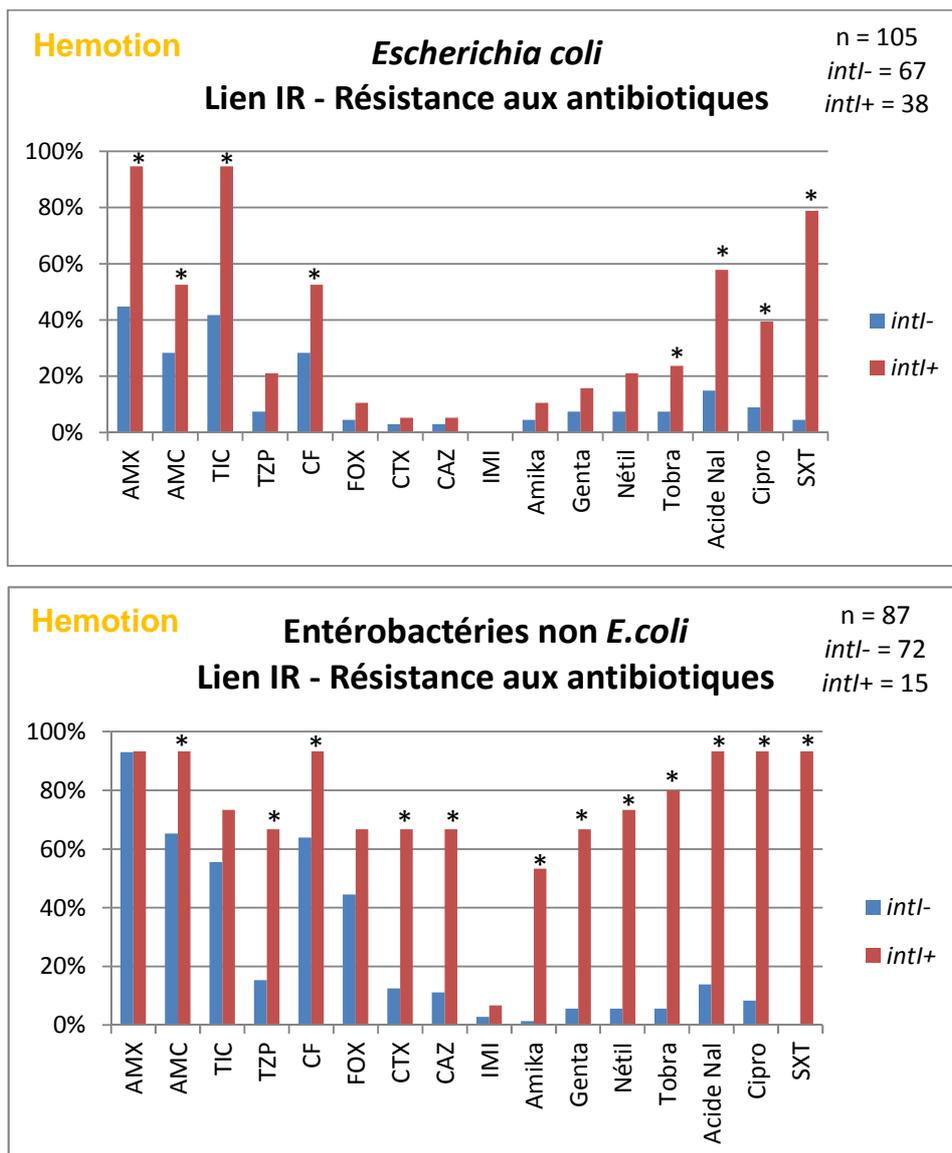


**Figure 8 :** Lien IR et résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries.

Cette figure représente parmi les entérobactéries qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR, le pourcentage d'entre elles qui sont résistantes à un antibiotique donné. Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 2. L'astérisque indique un lien statistique significatif.

Les données montrent qu'il existe un lien statistiquement significatif entre la présence d'IR et la résistance à de nombreux antibiotiques. Le lien est particulièrement marqué pour les pénicillines, les aminosides, les quinolones et fluoroquinolones et le cotrimoxazole.

La [Figure 9] représente le même lien IR – antibiotiques en séparant *E. coli* des entérobactéries non *E. coli*.

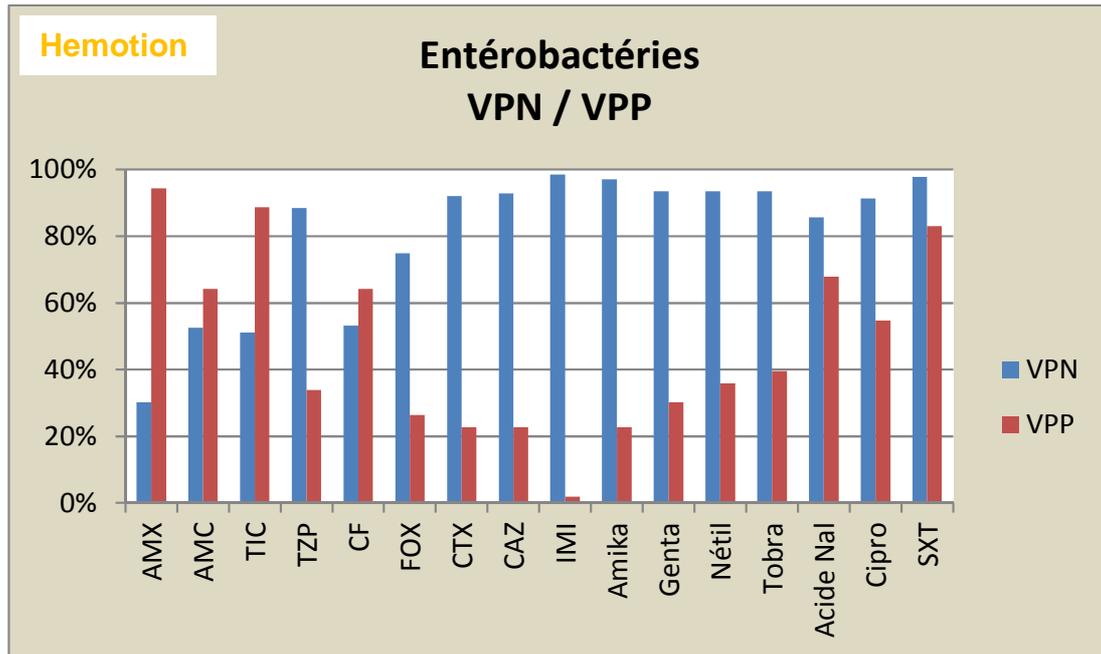


**Figure 9 :** Lien IR et résistance aux antibiotiques chez *E. coli* et les entérobactéries non *E. coli*.

Cette figure représente parmi les *E. coli* et entérobactéries non *E. coli* qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR, le pourcentage d'entre eux qui sont résistants à un antibiotique donné. Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 2. L'astérisque indique un lien statistique significatif.

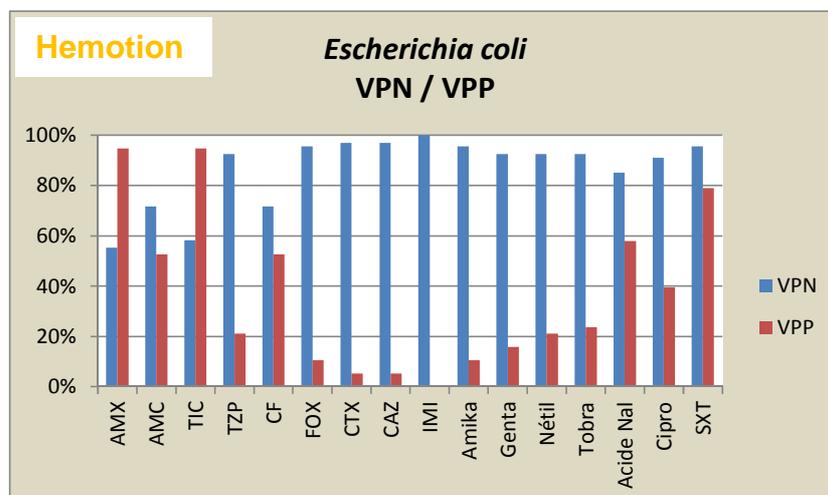
La distinction entre l'espèce *E. coli* et les entérobactéries non *E. coli* permet de rendre compte de certaines associations statistiques : la différence la plus évidente dans notre étude concerne les résistances aux C3G et aux aminosides qui ne sont liées statistiquement qu'aux entérobactéries non *E. coli* (excepté la tobramycine pour *E. coli*).

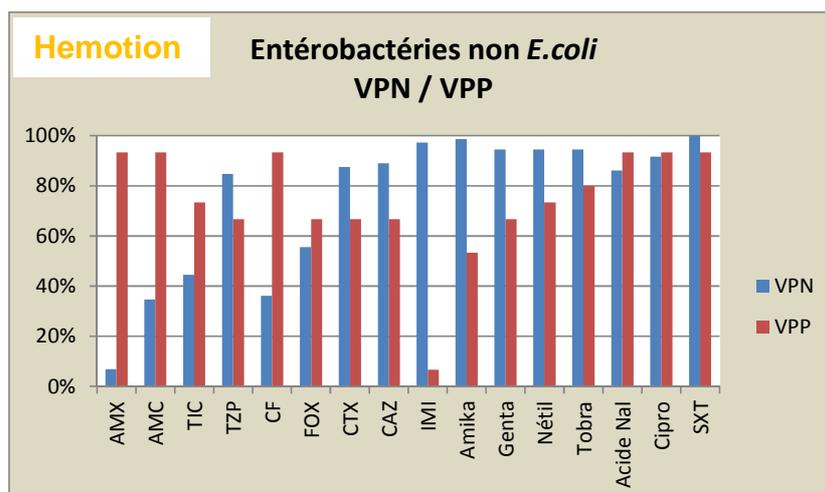
Une autre façon de présenter les choses est de déterminer les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) du marqueur IR pour chacun des antibiotiques testés [Figure 10]. Les VPP et VPN ont également été déterminés pour les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* et pour les entérobactéries non *E. coli* [Figure 11].



**Figure 10 :** Valeurs prédictives positives (VPP - rouge) et négatives (VPN - bleu) du marqueur IR pour chacun des antibiotiques testés vis-à-vis des entérobactéries.

Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 2.





**Figure 11 :** Valeurs prédictives positives (VPP - rouge) et négatives (VPN - bleu) du marqueur IR pour chacun des antibiotiques testés vis-à-vis des bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* et des entérobactéries non *E. coli*. Les abréviations des antibiotiques sont les mêmes que celles employées dans la Figure 2.

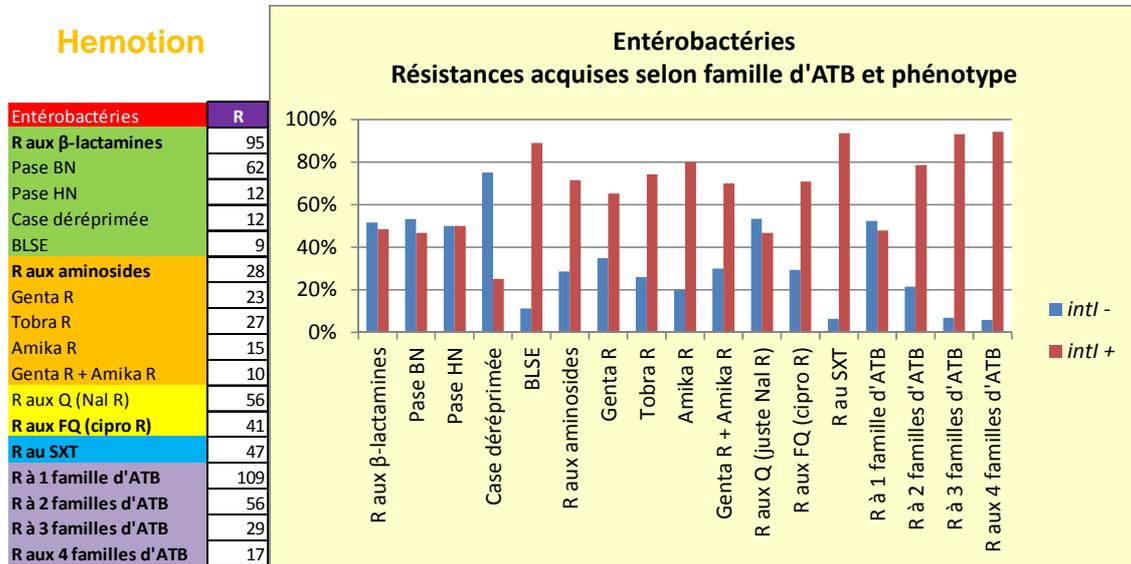
Les VPN vis-à-vis des C3G étaient > 92 % pour l'ensemble des entérobactéries, et égales à 97 % pour l'espèce *E. coli*. Vis-à-vis de la gentamicine, de la tobramycine et de la nétilmicine, les VPN étaient de 93,5 % ; pour l'amikacine, la VPN était de 97,1 %. Vis-à-vis de la ciprofloxacine et du cotrimoxazole, les VPN étaient respectivement égales à 91,4 % et 97,8 %.

Les VPP les plus élevées (93,3 %) concernaient les entérobactéries non *E. coli* vis-à-vis de l'acide nalidixique, de la ciprofloxacine et du cotrimoxazole.

#### 4.4.Lien IR et résistance par phénotype de résistance acquise

Cette représentation s'intéresse aux phénotypes de résistance acquise notamment vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (pénicillines de bas et haut niveau, céphalosporinase déréprimée, BLSE) ainsi que des résistances acquises à 1 ou plusieurs familles d'antibiotiques. Les 4 familles d'antibiotiques considérées sont les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les fluoroquinolones et le cotrimoxazole [Figure 12]. Pour chaque

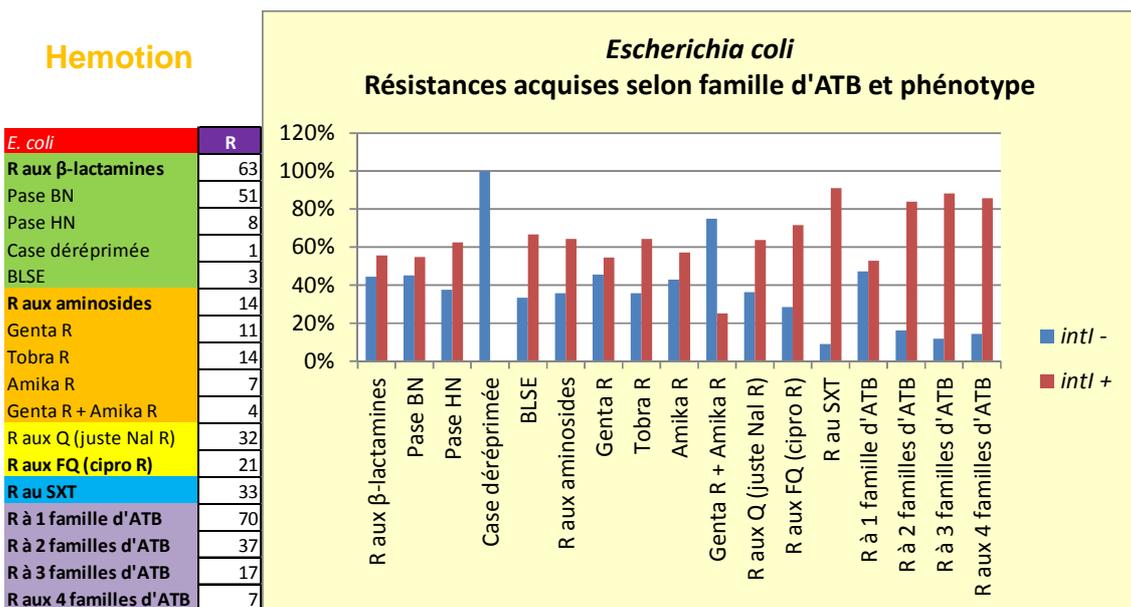
phénotype, le dénominateur est différent car on ne considère que les souches présentant tel ou tel phénotype.



**Figure 12 :** Lien IR – résistance par phénotype de résistance acquise chez les entérobactéries.

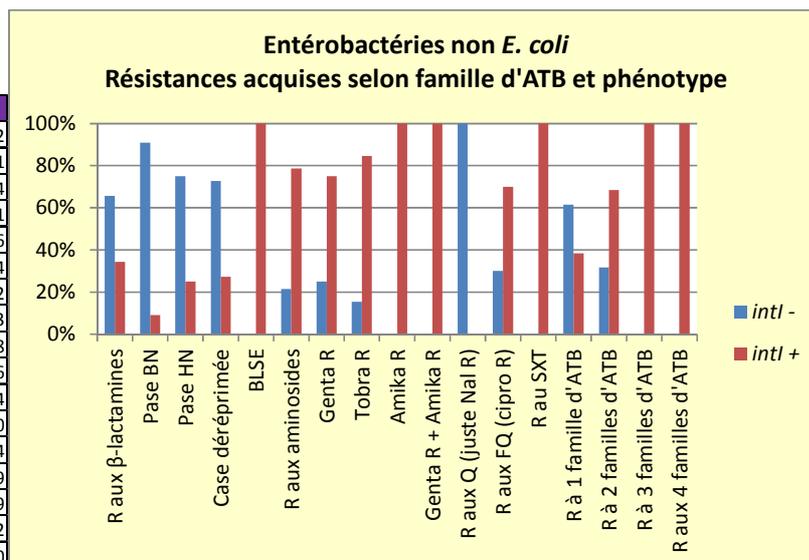
Le tableau indique le nombre de souches I/R pour chacun des phénotypes observés. ATB : antibiotique.

La même représentation a été réalisée pour les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* et pour les entérobactéries non *E. coli* [Figure 13].



## Hemotion

Entérobactéries non <i>E. coli</i>	R
R aux $\beta$ -lactamines	32
Pase BN	11
Pase HN	4
Case déréprimée	11
BLSE	6
R aux aminosides	14
Genta R	12
Tobra R	13
Amika R	8
Genta R + Amika R	6
R aux Q (juste Nal R)	24
R aux FQ (cipro R)	20
R au SXT	14
R à 1 famille d'ATB	39
R à 2 familles d'ATB	19
R à 3 familles d'ATB	12
R aux 4 familles d'ATB	10

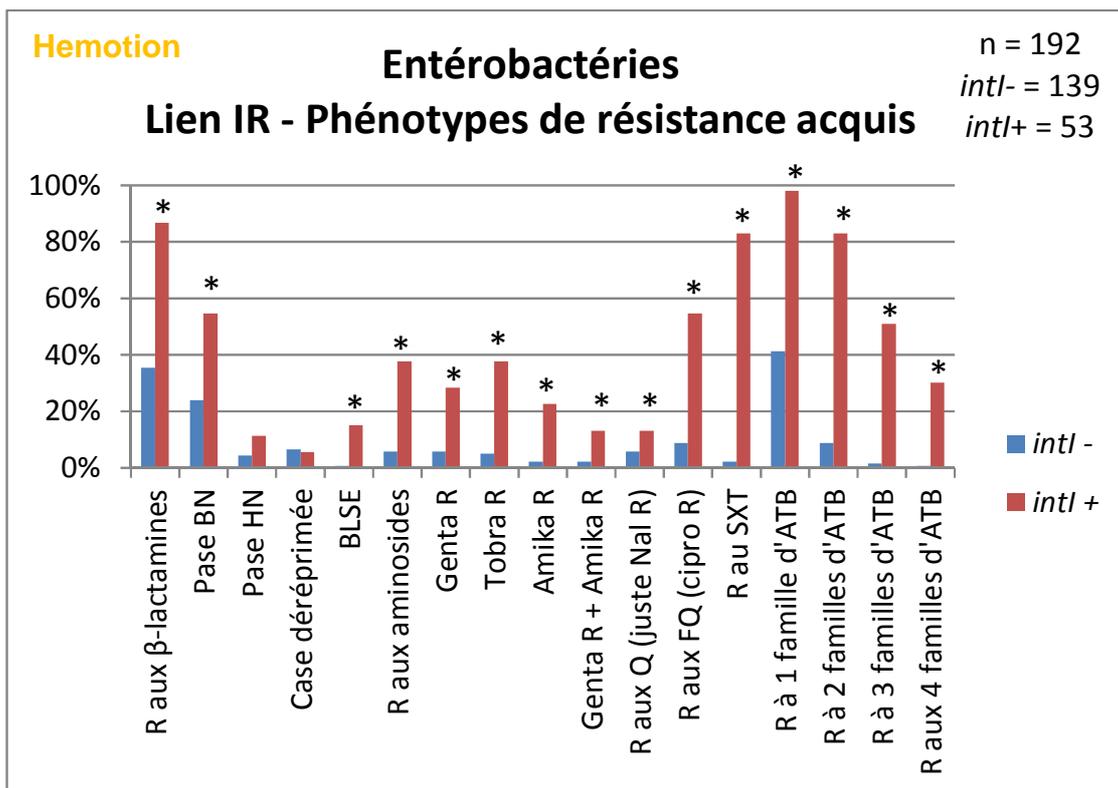


**Figure 13 :** Lien IR – résistance par phénotype de résistance acquise chez les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* et les entérobactéries non *E. coli*.

Le tableau indique le nombre de souches IR pour chacun des phénotypes observés. ATB : antibiotique.

Parmi les souches ayant un phénotype BLSE (n=9), 88,9 % hébergeaient un IR, ce chiffre était de 100 % pour les « entérobactéries hors *E. coli* » (n=6), mais les dénominateurs étaient faibles. Parmi les souches ayant acquis une résistance à 2 familles d'antibiotiques, 78,6 % possédaient un IR. Ce chiffre passait à 93,1 % pour les souches ayant acquis une résistance à 3 familles d'antibiotiques.

A l'image du lien déterminé entre les IR et les antibiotiques, le lien entre les IR et les phénotypes de résistance acquis ont été déterminés. Ce lien est représenté dans la [Figure 14] qui indique parmi les entérobactéries qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR combien présentent un phénotype de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines, aux aminosides... à 1 ou plusieurs familles d'antibiotiques. La distinction entre les principaux phénotypes de résistance aux aminosides a également été faite.

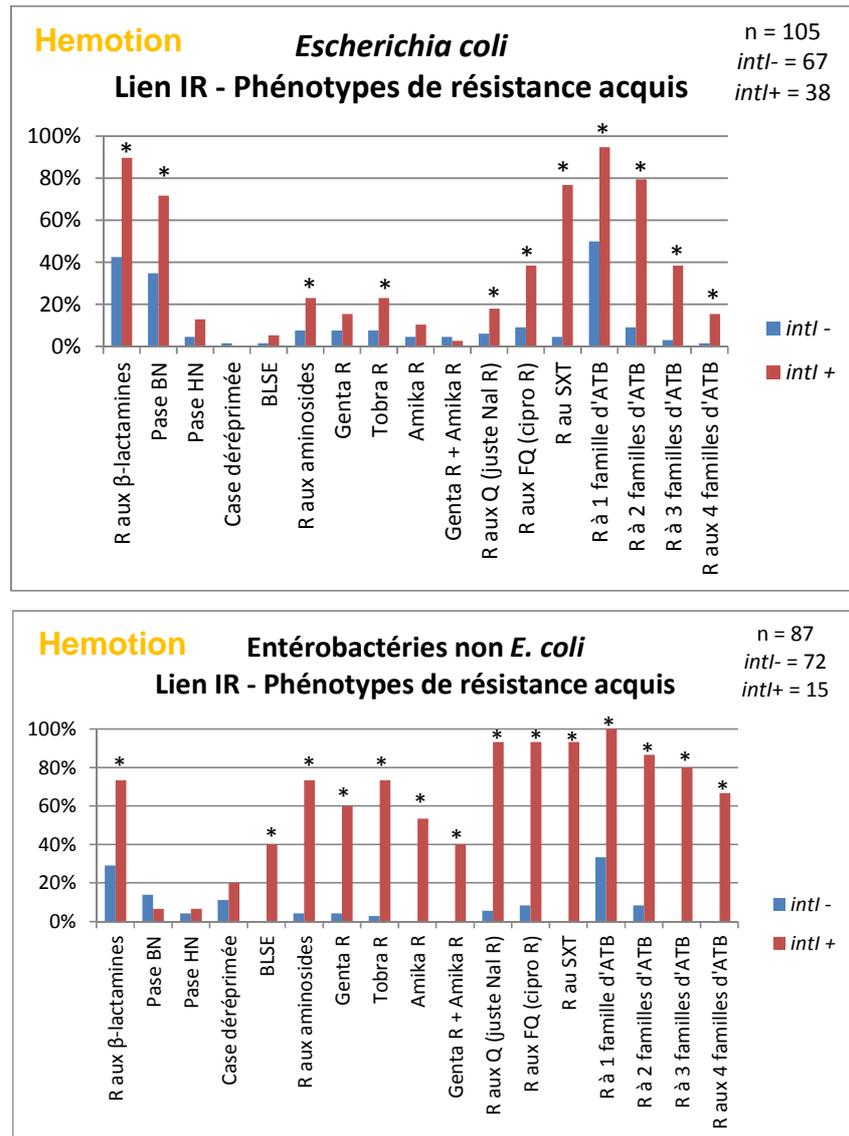


**Figure 14 :** Lien IR et phénotypes de résistance acquis aux antibiotiques chez les entéro bactéries.

Cette figure représente parmi les entéro bactéries qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR, le pourcentage d'entre elles qui présentent un phénotype de résistance acquis de type résistance aux  $\beta$ -lactamines, BLSE... Pase BN : pénicillinase de bas niveau ; Pase HN : pénicillinase de haut niveau ; Case déréprimée : céphalosporinase déréprimée. BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre élargi. L'astérisque indique un lien statistique significatif.

Excepté pour les phénotypes pénicillinase haut niveau et céphalosporinase déréprimée, les liens entre IR et les différents phénotypes de résistance acquis sont tous statistiquement significatifs, notamment en ce qui concerne la résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines et aux fluoroquinolones. La résistance acquise à 1, 2, 3 ou 4 familles d'antibiotique est statistiquement lié à la présence d'un IR.

Le lien entre les IR et les phénotypes de résistance acquis a aussi été déterminé pour l'espèce *E. coli* et les entéro bactéries non *E. coli* [Figure 15].

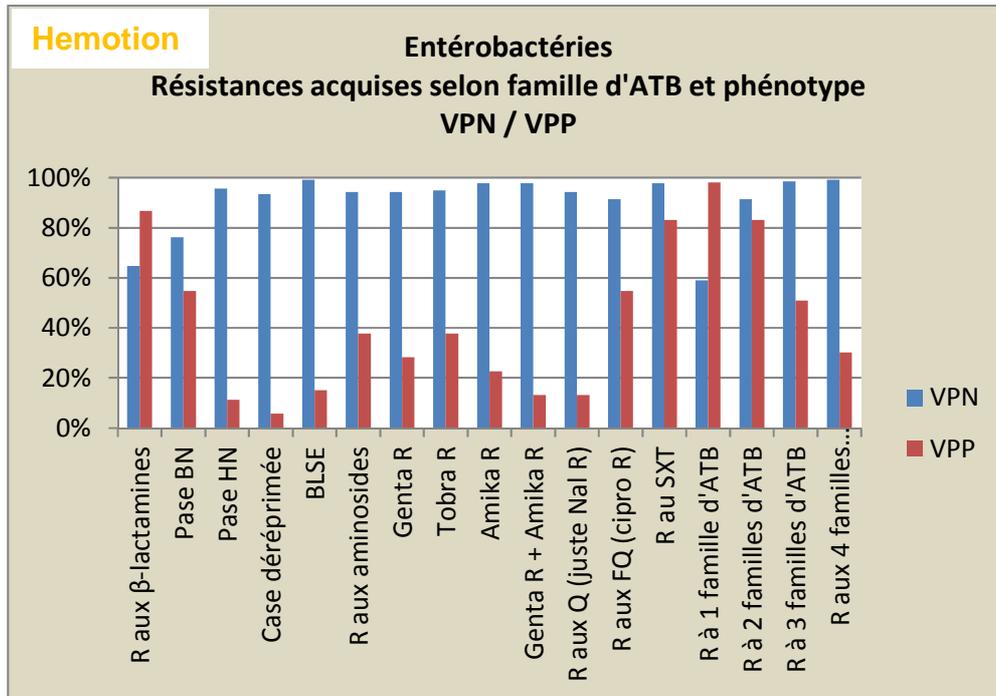


**Figure 15 :** Lien IR et phénotypes de résistance acquis aux antibiotiques de l'espèce *E. coli* et des entérobactéries non *E. coli*.

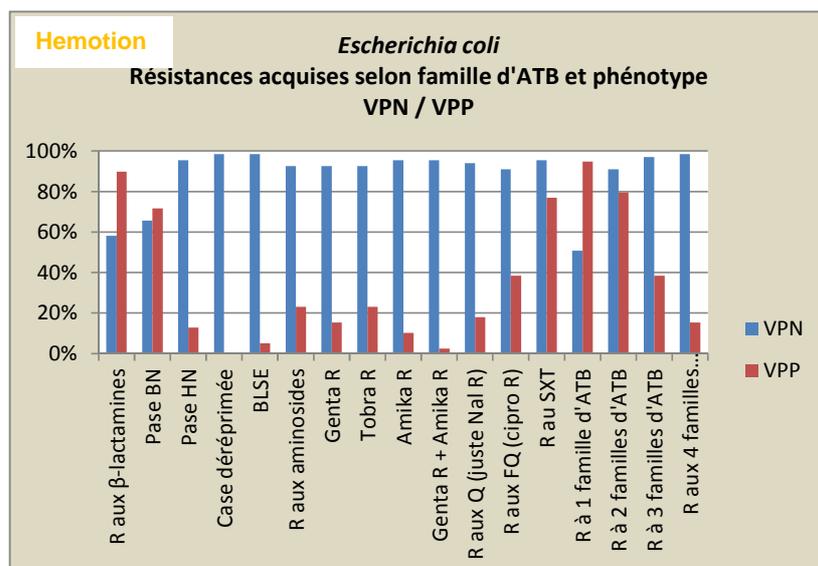
Cette figure représente parmi les souches qui hébergent (ou n'hébergent pas) un IR, le pourcentage d'entre elles qui présentent un phénotype de résistance acquis de type résistance aux β-lactamines, BLSE... Les abréviations sont les mêmes qu'à la figure 14. L'astérisque indique un lien statistique significatif.

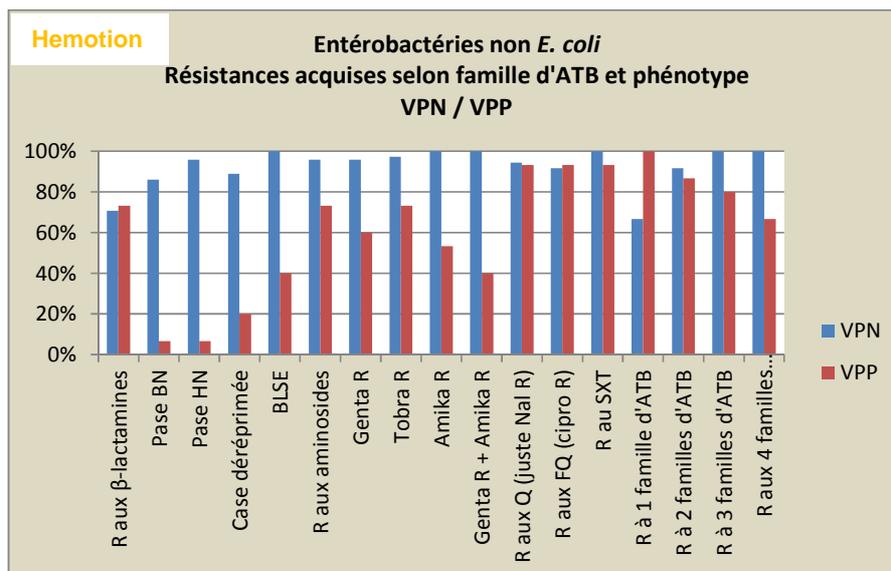
La principale information apportée, dans cette étude, est que le lien entre les IR et la résistance acquise aux β-lactamines est dû chez *E. coli* au phénotype pénicillinase alors qu'il est dû au phénotype BLSE chez les entérobactéries non *E. coli*. De plus, le lien avec la multirésistance à plusieurs familles d'antibiotiques semble plus important pour les entérobactéries non *E. coli*.

A l'image des résultats présentés par antibiotique, les VPN et VPP ont été déterminées vis-à-vis des phénotypes de résistance acquis ou du nombre de résistances acquises à 1 ou plusieurs familles d'antibiotiques [Figures 16 et 17].



**Figure 16 :** Valeurs prédictives positives (rouge) et négatives (bleu) du marqueur IR pour les entérobactéries selon le phénotype de résistance acquise ou le nombre de résistances acquises à 1 ou plusieurs familles d'antibiotiques.





**Figure 17 :** Valeurs prédictives positives (rouge) et négatives (bleu) du marqueur IR pour les *E. coli* et les entérobactéries non *E. coli* selon le phénotype de résistance acquise ou le nombre de résistances acquises à 1 ou plusieurs familles d'antibiotiques.

Les VPN des IR pour une résistance acquise de type pénicillinase de haut niveau, céphalosporinase de haut niveau et BLSE étaient respectivement de 95,7 %, 93,5 % et 99,3 %. La VPN pour une résistance acquise aux aminosides était de 94,2 % (95,8 % pour les entérobactéries non *E. coli*). La VPN des IR pour une résistance acquise à 2 familles d'antibiotiques était de 91,4 %, et de 98,6 % pour une résistance acquise à 3 familles (100 % pour les entérobactéries non *E. coli*).

La VPP pour une résistance acquise à 1 famille était de 98,1 % (100 % pour les entérobactéries non *E. coli*) et de 83,0 % pour une résistance acquise à 2 familles. La plupart des autres VPP était en deçà 80 %.

## 5. Analyse des résultats

L'objectif principal du protocole « Hemotion » était de déterminer si les IR pouvaient constituer un marqueur prédictif (positif ou négatif) d'acquisition de résistance aux antibiotiques chez les BGN.

Les résultats observés dans cette étude ont montré que le marqueur IR pouvait surtout constituer un marqueur intéressant en termes de valeur prédictive négative (VPN), particulièrement en ce qui concerne l'espèce *E. coli*. En effet, avec des VPN supérieures à 90 % pour les principales molécules utilisées en thérapeutique (97,0 % vis-à-vis des C3G, 95,5 % vis-à-vis de l'amikacine, 91,0 % vis-à-vis de la ciprofloxacine et 95,5 % vis-à-vis du cotrimoxazole), la détection du marqueur IR pourrait constituer une aide au clinicien dans son choix d'antibiothérapie probabiliste, qui plus est à l'heure de l'émergence de souches bactériennes totorésistantes. La bonne VPN de ce marqueur pourrait s'avérer intéressant dans un but de préservation de l'arsenal thérapeutique. En termes de valeur prédictive positive (VPP), le marqueur s'est révélé décevant excepté en ce qui concerne la résistance acquise à 1 famille d'antibiotique (98,1 % pour l'ensemble des entérobactéries).

La bonne détection du marqueur IR directement à partir des flacons d'hémoculture positifs à BGN (98,5 % de concordance avec la culture) est un élément important : il semble nécessaire dans le cadre d'une potentielle utilisation du marqueur IR en clinique de pouvoir le détecter directement à partir de liquides biologiques avant l'obtention de la culture bactérienne. Néanmoins de nombreux tests sont à réaliser pour valider cela, les essais dans Hemotion s'étant cantonnés à des flacons d'hémoculture positifs contenant de grandes quantités de bactéries et pour lesquels il n'était donc pas nécessaire d'avoir une grande sensibilité pour détecter les IR s'ils sont présents.

# **Chapitre 3 :**

## **Discussion générale**

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'effet de la pression de sélection antibiotique sur les intégrons de résistance (IR). Pour cela nous avons abordé différents aspects (i) étudier les capacités de l'intégrase à assurer des réarrangements de cassettes au sein d'un IR chez une bactérie réceptrice soumise à une pression de sélection antibiotique choisie et maîtrisée, (ii) détecter les IR de façon sensible et spécifique à partir d'environnements complexes pour lesquels un effet de la pression de sélection antibiotique est connu. Pour cela, il a été nécessaire de développer une technique de détection rapide, sensible et spécifique des IR, (iii) évaluer la valeur prédictive des IR comme marqueur de résistance acquise aux antibiotiques.

### *1) Pression de sélection antibiotique et réarrangement de cassettes d'intégrons de résistance*

Les principaux travaux concernant les réarrangements de cassettes au sein d'un IR ont été menés il y a une quinzaine d'années par une équipe australienne avec pour objectif principal non pas de mettre en évidence un effet de la pression de sélection antibiotique sur le réarrangement de cassettes mais plutôt de mettre en évidence les capacités d'intégration et d'excision de cassettes par l'intégrase [18, 27, 35, 36]. Dans leurs expériences, l'intégrase était surexprimée pour pouvoir visualiser avec une fréquence suffisamment importante des réarrangements de cassettes. Les auteurs disposaient d'un IR hébergeant les 3 cassettes *aacC1-orfE-aadA2* et avaient montré que l'intégrase IntI1<sub>R32\_H39</sub> surexprimée en *trans* était capable de réaliser, des excisions de cassettes (*aacC1-orfE*), voire même à une plus faible fréquence des duplications de

cassettes (*aadA2- aacC1-orfE-aadA2*), et ce, sans qu'ils aient exercé de pression de sélection antibiotique, mais simplement en réalisant des cultures sur la nuit en milieu liquide [35]. Lorsqu'ils réalisaient la même expérience en sélectionnant la culture issue du milieu liquide sur un milieu contenant de la spectinomycine (résistance codée par *aadA2*), ils avaient constaté des réarrangements supplémentaires qui contribuaient tous à augmenter l'expression d'*aadA2* et donc le niveau de résistance à cet antibiotique : duplications de la cassette *aadA2*, excisions des autres cassettes situés en amont rapprochant ainsi *aadA2* de Pc, déplacement de la cassette *aadA2* en première position avec notamment le réarrangement *aadA2-aacC1-orfE* observé une fois. Suite à cette observation, le modèle de réarrangements de cassettes « à façon » permettant de mobiliser la cassette *ad hoc* selon la pression de sélection antibiotique exercée, a été considéré comme une quasi-règle par la plupart des auteurs. Certains pourtant se sont heurtés à l'impossibilité de mettre en évidence un réarrangement de cassettes sous pression de sélection antibiotique telle cette équipe allemande qui n'a pu constater de mouvement de la cassette *bla<sub>OXA-2</sub>* en soumettant des bactéries à une pression de sélection par de l'ampicilline [226].

Nos travaux avaient pour but de mieux comprendre les capacités de réarrangement de cassettes par l'intégrase *IntI1* lorsqu'une bactérie *E. coli* hébergeant un IR, dans notre étude l'IR synthétique *intI1-aac(6')-Ib-dfrA15-aadA1-catB9*, était soumise à une pression de sélection par du chloramphénicol (résistance codée par *catB9*). Les essais ont été menés avec différents variants de Pc (et donc différents variants d'intégrase), avec ou sans surexpression de l'intégrase. Le principal résultat de notre travail est d'avoir montré que dans les conditions les plus proches de la réalité, c'est-à-dire sans surexpression de l'intégrase, celle-ci était capable de rapprocher *catB9*

de Pc, permettant ainsi à la bactérie de croître en présence de concentrations de chloramphénicol plus importantes que la CMI initialement mesurée. Cette observation, systématiquement observée quel que soit le variant de Pc, était toujours due à la délétion des cassettes *dfrA15* et *aadA1* conduisant au réarrangement *intI1-aac(6')-Ib-catB9*. Le réarrangement attendu qui aurait vu un « déplacement » de *catB9* en première position (*intI1-catB9-aac(6')-Ib-dfrA15-aadA1*) n'a pas été observé, y compris lors des expérimentations menées avec une surexpression de l'intégrase. Le fait que la cassette *catB9* n'a jamais été retrouvée en première position lors des expérimentations menées en l'absence de surexpression de l'intégrase pourrait s'expliquer par le fait que la cassette *aac(6')-Ib* semble particulièrement difficile à exciser de sa première position en raison d'une mauvaise affinité d'IntI1 pour le motif C-N<sub>6</sub>-G de son site *attC* [43]. Des expériences *in vitro* permettant d'étudier le pouvoir recombinogène de chacun des sites *attC* des 4 cassettes sont en cours. Ainsi, nous pourrions étudier si certaines cassettes sont plus facilement « excisables » que d'autres.

Par ailleurs, ce travail a confirmé le fait que toutes les intégrases ne présentent pas la même efficacité de recombinaison [14] : l'intégrase IntI1<sub>R32\_H39</sub>, correspondant aux variants PcW et PcH1, est celle qui, dans un modèle de laboratoire, possédait la plus grande activité de recombinaison [14] ; dans notre travail, elle a été effectivement la seule capable, lorsqu'elle était surexprimée, de générer des recombinaisons de toutes les cassettes de l'IR et notamment d'amener *catB9* en première position. Les expériences avec les autres intégrases, même surexprimées n'ont pas permis d'obtenir de réarrangements multiples autres que le réarrangement *aac(6')-Ib-catB9*. Ce résultat est en accord avec les recombinaisons multiples observées par les auteurs australiens [35, 36] qui avaient employé l'intégrase IntI1<sub>R32\_H39</sub> (ils n'avaient pas mené d'essais

avec les 2 autres intégrases IntI1<sub>R32\_N39</sub> et IntI1<sub>P32\_H39</sub>). Cette intégrase IntI1<sub>R32\_H39</sub> est celle qui correspond aux IR de classe 1 ayant les variants faibles de Pc (PcW et PcH1). Or, une étude chez des souches de *E. coli* isolées de prélèvements en clinique et de sujets sains a montré que effectivement ces variants faibles étaient majoritaires [259] alors qu'une autre étude *in silico* avaient montré que le variant fort PcS était le plus fréquent [14]. Cependant, le lien entre prédominance des intégrases avec les variants faibles de Pc et la capacité accrue de réarrangements est à confirmer dans d'autres situations et avec d'autres espèces bactériennes.

Dans notre travail, les résultats de réarrangements multiples n'ont été obtenus que lorsque l'intégrase IntI1<sub>R32\_H39</sub> était surexprimée en *trans* ; dans les conditions natives, elle n'a pas permis plus de réarrangements, même lorsque l'inhibition par LexA était inefficace (site de fixation de LexA muté). Il a été suggéré qu'il existait un équilibre entre expression des cassettes et capacité de réarrangements [14] ; en effet, les intégrons avec les variants de Pc les plus forts sont ceux dont les intégrases ont la moins bonne efficacité et de plus il existe une interférence transcriptionnelle entre le variant fort PcS et le promoteur de l'intégrase empêchant l'expression de celle-ci [52]. Or dans notre travail, nous avons obtenu une augmentation de la résistance au chloramphénicol avec toutes les intégrases et de façon surprenante, même lorsqu'elles étaient réprimées par LexA. Une autre régulation de l'expression de l'intégrase est à envisager. Il a été montré récemment que l'intégrase serait aussi sous la dépendance de régulations liées aux protéines du nucléoïde avec notamment une répression par la protéine FIS dont l'expression n'est pas constante selon la phase de croissance [260]. Ainsi, il pourrait y avoir au cours du cycle de croissance de la bactérie une levée de la répression par FIS permettant une faible expression de l'intégrase même en présence de LexA.

Enfin, nous avons confirmé le lien entre position de la cassette au sein d'un IR et niveau d'expression du gène hébergé. Plus la cassette *catB9* était proche de Pc, plus le niveau d'expression du gène était important, confirmant ce qui avait été montré antérieurement sur l'influence de la position de la cassette sur son expression [54]. La quantification des transcrits a montré qu'il y avait une relation entre la position de la cassette et la quantité de transcrits produits. Cependant, nous avons obtenu des CMI identiques (256mg/l) alors que la cassette *catB9* avait différentes positions au sein du réseau et que le nombre de transcrits était différent. L'analyse des transcrits ne reflète que la transcription alors que la traduction peut avoir aussi des effets sur l'expression de la résistance. En effet, les régions d'initiation de la traduction ne sont pas de même efficacité selon les cassettes et des couplages traductionnels ont été décrits, soit à partir de ORF11 [56], soit à partir de certains sites *attC* contenant des ORFs [55]. Ce couplage traductionnel a été observé pour des cassettes n'ayant pas de région d'initiation de la traduction, soit environ 20% des cassettes connues [55]. Or, le gène *catB9* possède une région d'initiation de la traduction qui devrait être efficace. Par ailleurs, l'analyse de la séquence du site *attC* de la cassette *aac(6')-Ib* n'a pas permis de mettre en évidence une ORF qui pourrait jouer un rôle de couplage traductionnel.

Ce travail a montré que l'expression d'un gène et les capacités de réarrangement des cassettes au sein d'un IR étaient liées : une bactérie pouvant être initialement considérée comme sensible (S) (cas de la bactérie hébergeant l'IR avec PcW avec une CMI initiale à 8 mg/L et donc catégorisée sensible selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, recommandations 2011) peut voir le niveau d'expression du gène augmenter et la faire alors catégoriser comme résistante (R). Ce système permet donc à la bactérie une épargne énergétique : en effet, une bactérie peut

ainsi posséder des gènes de résistance qui ne sont pas ou peu exprimés et une intégrase peu ou pas exprimée car réprimée par LexA. En présence d'un stress qui peut être un stress antibiotique, l'activation de l'intégrase va pouvoir réarranger l'ordre des cassettes permettant ainsi à la bactérie d'exprimer de façon plus importante un gène en le rapprochant du promoteur Pc.

Au vu de ces résultats, l'intégrase catalyserait des réarrangements de cassettes de façon aléatoire puis les bactéries ayant les réarrangements qui permettent d'assurer sa survie seraient sélectionnées par l'antibiotique. Il serait intéressant de reproduire ce travail avec une autre cassette et un autre antibiotique pour voir si les résultats obtenus ici ne sont pas dus à notre modèle.

## *2) Pression de sélection antibiotique et intégrons de résistance dans des environnements complexes*

Les réarrangements de cassettes constatés sous pression de sélection antibiotique n'ont, à notre connaissance, jamais été observés dans des situations « naturelles » de pression de sélection. Dans un premier temps, il nous fallait développer un outil qui nous permette de détecter aisément les trois principales classes d'IR non seulement à partir d'isolats bactériens mais aussi à partir d'échantillons biologiques plus complexes dans lesquels une pression de sélection antibiotique peut exister (environnement, animal, homme).

*a. Mise au point d'une qPCR de détection des 3 principales classes d'IR*

Les intégrases IntI1, IntI2 et IntI3 présentent de très fortes identités en acides aminés [8] ; elles sont également très importantes en terme de nucléotides. Un alignement des séquences réalisé avec le logiciel T-Coffee (<http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>) a montré une identité de 74 % entre *intI1* et *intI2*, de 77 % entre *intI2* et *intI3* et de 89 % entre *intI1* et *intI3*. Ces valeurs élevées expliquent la difficulté d'emploi d'une PCR consensus pour détecter les IR ; il existe des dizaines d'amorces localisées sur toute la séquence du gène *intI* pour détecter les IR, avec parfois des problèmes de spécificité [261]. L'objectif lors de la mise au point de notre qPCR était d'obtenir la meilleure spécificité possible et d'éviter des amplifications aspécifiques tant entre les différentes intégrases qu'avec d'autres séquences. Les essais menés lors de la mise au point de la qPCR n'ont pas révélé de réactions croisées aspécifiques, aussi bien avec de fortes concentrations en plasmides témoins qu'avec les ADN génomiques de souches témoins renfermant les deux autres intégrases. Disposer d'une bonne sensibilité de la réaction était aussi un paramètre souhaité afin de pouvoir étudier des environnements génétiques plus complexes qu'un simple isolat bactérien et donc détecter des concentrations en IR parfois faibles (dans les liquides biologiques notamment). La technique de qPCR permet de détecter, en condition multiplex, jusqu'à  $10^2$  copies d'un gène d'intégrase, et ce, quelle que soit la concentration des autres gènes d'intégrase présents. Elle présente néanmoins comme principal écueil de ne pas disposer de témoin interne d'amplification : elle ne permet pas de distinguer la présence d'inhibiteurs (faux négatif) d'un vrai négatif. L'ajout d'un autre couple d'amorce et d'une autre sonde ciblant par exemple le gène codant l'ARN ribosomal 16S ou le gène codant la  $\beta$ 2-microglobuline est possible mais au risque de perturber les efficacités

d'amplification des trois autres réactions. La solution la plus simple est soit de réaliser en parallèle une autre qPCR ciblant un autre gène sur le même échantillon, soit de réaliser une contamination volontaire de l'échantillon en rajoutant dans une deuxième réaction une quantité fixe d'un gène cible (par exemple *intI3*). Outre les risques de contamination, cette méthodologie implique des coûts supplémentaires.

La technique de qPCR a dans un premier temps été utilisée pour cribler un grand nombre de souches pour tester sa robustesse.

#### *b. Détection d'IR chez Corynebacterium diphtheriae*

Grâce à une collaboration avec le CNR des corynébactéries toxigènes à l'Institut Pasteur de Paris, nous avons pu identifier parmi des dizaines de *C. diphtheriae* un isolat toxigène, FRC24, qui hébergeait un IR de classe 1. Le réseau de cassettes, *dfrA16-qacH*, était sous contrôle du variant fort PcW<sub>TGN-10</sub> suivi de la région 3' conservée des IR de classe 1 avec notamment le gène *sulI*. La souche, isolée d'une plaie cutanée, présentait un haut niveau de résistance à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole ainsi qu'une résistance aux antiseptiques (ammoniums quaternaires).

Cet IR s'ajoute aux quelques dizaines de descriptions d'IR retrouvées chez des bactéries à Gram positif et notamment chez des corynébactéries. A été mis en évidence pour la première fois dans le genre *Corynebacterium* une cassette de type *dfr* conférant une résistance inhabituelle de cette espèce au triméthoprime. La résistance globale à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole est d'un intérêt clinique important en raison de l'utilisation importante de cet antibiotique dans les pays en voie de développement notamment dans le traitement des affections digestives ; malgré une

histoire clinique non connue, étant donné l'origine géographique de l'isolat et la localisation cutanée, il est possible d'émettre l'hypothèse que FRC24 a pu être sélectionné par un traitement antibiotique ou antiseptique antérieur. Cette hypothèse peut également être évoquée suite à la mise en évidence tout récemment à partir d'une lésion cutanée d'une autre souche de *C. diphtheriae*, d'origine indienne, multirésistante aux antibiotiques et notamment au cotrimoxazole [262] ; la multirésistance chez l'agent de la diphtérie est un phénomène rare et semble-t-il émergent ; il semble désormais judicieux de rechercher la présence d'IR chez de telles bactéries.

L'environnement génétique de l'IR, à savoir le transposon *IS6100* a déjà été décrit antérieurement chez d'autres espèces de corynébactéries hébergeant des IR [122, 123] mais aussi chez *Mycobacterium* [121] : cet élément génétique pourrait jouer un rôle dans la diffusion des IR au sein des bactéries à Gram positif.

### *c. Détection d'IR à partir d'environnements complexes*

#### *i. Les effluents*

Les effluents hospitaliers contiennent d'importantes concentrations d'antibiotiques et de leurs métabolites ; ils sont des lieux privilégiés en termes de pression de sélection antibiotique [209]. Nous avons recueilli un échantillon d'effluent du CHU de Limoges et réalisé une mise en culture à la recherche d'un maximum de BGN porteurs d'IR. L'un des isolats, LIM73, appartenant à l'espèce *E. cloacae*, hébergeait un IR de classe 3 inédit localisé sur un plasmide mobilisable *IncQ-like*. Le réseau de cassettes contenait, comme chez la plupart des IR de classe 3 décrits dans un contexte clinique [15, 16, 62], une cassette de résistance aux  $\beta$ -lactamines (*bla<sub>OXA-10</sub>*) et

une cassette de résistance aux aminosides (*aac(6')-Ib*). L'IR était proche de celui décrit chez *K. pneumoniae* [16] et *E. coli* [62] à la différence près que la cassette *bla<sub>OXA-10</sub>* n'était pas tronquée. La localisation de cet IR sur un plasmide mobilisable *IncQ-like* à large spectre d'hôte permet sa diffusion efficace au sein du monde bactérien.

L'origine de la bactérie reste difficile à déterminer étant donné l'origine de l'échantillon ; la découverte d'autres entérobactéries isolées d'urines avec des IR de classe 3 de contenu identique en cassettes [15, 16, 62] est en faveur d'une probable origine humaine de LIM73 mais la découverte d'un IR de classe 3 dans des effluents alors même qu'aucun IR de classe 3 n'a été mis en évidence à partir de 500 échantillons de selles humaines (cf Axe épidémiologique - Partie 3) va à l'encontre de cette hypothèse et fait plutôt évoquer une origine hydrique de la bactérie, plusieurs études retrouvent d'ailleurs des intégrons de classe 3 dans les environnements aqueux [64-66]. De plus, l'analyse de l'environnement génétique a montré que cet IR de classe 3 a été inséré dans le plasmide pUL3AT par un événement de transposition ; cette caractéristique permet d'émettre une hypothèse quant à l'origine de cet IR, ainsi qu'à celle des autres IR isolés en clinique : il est envisageable que dans un premier temps, un intégron de classe 3 chromosomique « s'intègre » par un événement de transposition sur un plasmide (*IncQ-like* dans notre cas) avant qu'il n'acquière secondairement des cassettes de résistance aux antibiotiques, si présence dans la même bactérie d'IR de classe 1 avec des cassettes de résistance. L'événement inverse a d'ailleurs été décrit récemment avec la découverte au sein d'un IR de classe 1 de la cassette *orfB* [75] initialement décrite au sein du réseau de cassette de l'intégron chromosomique de classe 3 décrit chez l'espèce *Delftia tsuruhatensis* [64] indiquant que des échanges de cassettes se produisent entre IR de classe différentes comme cela avait été montré

expérimentalement. Il a effectivement été montré auparavant que chaque intégrase IntI présente une certaine spécificité pour son site *attI* bien que l'intégrase IntI1 se montre toutefois la plus tolérante et peut catalyser des recombinaisons avec *attI2* ou *attI3* [263, 264]. En revanche, toutes les intégrases sont capables de recombiner tous les sites *attC*.

Outre le réseau de cassettes inédit, la principale caractéristique de l'IR de classe 3 identifié chez LIM73 est la présence d'un codon rare AUA en lieu et place du codon AUG usuel de l'intégrase IntI3. Si ce codon AUA était le codon d'initiation, l'intégrase IntI3 serait probablement produite en petite quantité, un tel codon ayant été décrit comme fonctionnel mais avec peu d'efficacité [265, 266]. Cette mutation inédite remet en cause la position du codon d'initiation de la traduction de l'intégrase, une valine pouvant faire office de codon d'initiation une trentaine de bases en amont ; en outre, elle serait compatible avec le 2<sup>ème</sup> promoteur évoqué par Collis *et al* [31]. Cependant, le site de fixation de la protéine LexA chevauche le gène *intI3* et la mutation G-A entraîne une séquence CTGGATGCATAAACAG (au lieu de CTGGATGCATGAACAG) plus proche du site idéal et consensus de LexA CTGTATATATATACAG [47] ; néanmoins, des essais de retard sur gel ont montré que LexA se fixait aussi bien sur cette boîte que sur celle de la séquence de l'IR de classe 3 In3-1[15]. Même si cela reste à démontrer, étant donné la localisation « éloignée » de la boîte LexA, il semble peu probable que le 2<sup>ème</sup> promoteur PintI3 évoqué précédemment puisse être régulée par la réponse SOS. Des expériences pour déterminer quel est le promoteur d'*intI3*, mais aussi pour identifier le codon d'initiation de la traduction de la protéine IntI3 sont en cours d'investigation au laboratoire.

Au total, ce travail a souligné l'intérêt de rechercher des IR de classe 3 à partir de bactéries isolées d'environnements hydriques.

## ii. Portage digestif

L'objectif de nos travaux sur le portage digestif en IR était double : (i) évaluer le portage par une approche novatrice basée sur la détection des IR directement à partir d'un extrait d'ADN d'un échantillon de selles et d'un bouillon d'enrichissement, tout en le comparant aux résultats d'une approche conventionnelle de culture des BGN, (ii) comparer 2 populations de patients dont les pressions de sélection antibiotique étaient *a priori* différentes, l'une soumise à une pression de sélection considérée comme faible (250 individus de la population générale = Groupe 1), l'autre à une pression de sélection considérée comme forte (250 patients hospitalisés en unités de soins intensifs = Groupe 2).

L'approche conventionnelle a mis en évidence, indépendamment des IR, une variété d'espèces bactériennes beaucoup plus large dans le Groupe 2 même si *E. coli* restait l'espèce majoritaire dans les 2 groupes (84,4 % *versus* 60,5 % des BGN isolés). Cette différence n'est pas anodine car plusieurs espèces autres qu'*E. coli* hébergeaient des IR dans le Groupe 2. Ainsi, alors que dans le Groupe 1, *E. coli* était l'espèce responsable de 93 % du portage d'IR (seuls 4 patients étaient porteurs d'IR *via* d'autres BGN), elle n'expliquait que 2/3 du portage en IR dans le Groupe 2, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* expliquant respectivement 15,5 % et 7 % des portages. Ces données soulignent l'importance lors d'une approche conventionnelle visant à déterminer le portage digestif en IR de ne pas se cantonner à la seule espèce *E. coli*, qui est pourtant, à de rares exceptions près [144], la seule espèce considérée lors des études antérieures de portage digestif en IR [145-147]. Nous avons déterminé le portage digestif en IR en considérant les 3 principales classes d'IR, ce qui chez l'homme n'avait jamais été évalué, les auteurs ciblant uniquement les IR de classe 1.

Au total, par cette approche conventionnelle, le taux de portage en IR a été déterminée à 22,8 % dans le Groupe 1 et à 28,4 % dans le Groupe 2, soit des taux très comparables à ceux retrouvés dans la littérature avec des valeurs qui oscillent généralement entre 15 et 30 % [144-147]. Ces taux étaient imputables quasi-exclusivement aux IR de classe 1, les taux de portage en IR de classe 2 étant de 2,4 % dans les 2 groupes (soit seulement 6 patients) et ceux en IR de classe 3 de 0 %. La différence de pourcentage entre les 2 groupes n'était pas significative ( $p = 0,18$ ) même si une « tendance » allait dans le sens d'études antérieures et rejoignait l'idée que la pression de sélection antibiotique pouvait sélectionner les bactéries porteuses d'IR [79].

Les données de prévalence en IR obtenues par l'approche globale ont été plus importantes et significativement différentes ( $p < 0,05$ ) des données issues de l'approche conventionnelle. Ces prévalences aux alentours de 50 % sont difficiles à comparer avec d'autres études car aucune menée chez l'homme n'a utilisé ce type d'approche. Néanmoins, nos résultats rejoignent ceux d'une étude comparable menée chez des bovins où les portages digestifs en IR de classe 1 et 2 avaient été déterminés à partir de bouillons d'enrichissement de selles [163]. Les auteurs avaient mis en évidence des taux de portage plus de 2 fois supérieurs à ceux retrouvés à partir des BGN : 86 % d'IR de classe 1 et 94 % d'IR de classe 2 avec la technique d'enrichissement *versus* 50 % et 28 % avec la culture conventionnelle. Ces résultats suggèrent que d'autres BGN non isolés sont porteurs d'IR mais aussi très vraisemblablement d'autres bactéries non recherchées (BGP, anaérobies, microaérophiles...) ou dites viables non cultivables. Les phénomènes de compétition peuvent également expliquer le fait que certains BGN *intI+* ne poussent pas sur gélose ; des milieux sélectifs contenant des antibiotiques auraient pu être utilisés en parallèle de la gélose Drigalski afin de dévoiler leur présence. Dans notre

étude, les taux d'IR constatés à partir des bouillons d'enrichissement étaient supérieurs à ceux constatés à partir des extraits d'ADN de selles : ceci semble logique et s'explique par le fait que des bactéries *intI+* présentes dans les selles en quantités très faibles, inférieures au seuil de détection de la qPCR, aient vu leur quantité augmenter et passer au-dessus de ce seuil après enrichissement en bouillon BHI. Pour les quelques cas où le phénomène inverse s'est produit, on peut penser qu'après enrichissement, en raison des phénomènes de compétition, une bactérie *intI+* détectée à partir des selles ait vu sa quantité relative diminuer et passer en deçà du seuil de détection de la technique.

Les données recueillies concernant l'antibiothérapie ont clairement montré que les patients des 2 groupes n'étaient pas soumis à la même pression de sélection antibiotique, 6,8 % des patients du Groupe 1 ayant pris un traitement antibiotique dans les 3 mois précédents le prélèvement, *versus* 84,8 % des patients du Groupe 2. Pour autant, les chiffres de prévalence des IR étaient importants dans les 2 groupes, ce qui tend à montrer que la prise d'antibiotique n'a en fait que peu d'influence sur le portage des IR. Cette hypothèse est même confortée par le fait qu'au sein des patients du Groupe 2 qui n'avaient pas reçu d'antibiotiques, 65 % étaient porteurs d'IR *versus* 52 % parmi ceux qui avaient reçu des antibiotiques. L'influence d'autres facteurs tels que l'âge, le sexe, les antécédents d'hospitalisation, le mode de vie, les pathologies chroniques ou l'alimentation nécessiteront d'être explorées dans des études futures afin de mettre en évidence un éventuel facteur qui explique qu'un sujet soit porteur d'IR et pas un autre. A noter que les patients du Groupe 1 n'étaient peut-être pas parfaitement représentatifs de la population dite « générale » : il s'agissait de personnel de restauration collective n'ayant pas de contact direct avec des patients mais travaillant néanmoins dans un environnement hospitalier. Un taux de portage moindre aurait peut-

être été observé si ce groupe avait été constitué de volontaires sains sans lien direct avec l'hôpital. Concernant les patients du Groupe 2, ils ont été recrutés à un instant t après au moins 48 heures d'hospitalisation en USI mais un seul échantillon de selles a été recueilli. Il serait intéressant de développer une étude étudiant le portage digestif en IR tout au long du séjour du patient et d'étudier si des facteurs de risque influent sur ce portage.

### *3) Pression de sélection antibiotique et intégrons de résistance : un lien pertinent ?*

Ayant pu détecter de façon efficace des IR chez des souches bactériennes et dans des environnements plus complexes, nous avons voulu évaluer si les IR pouvaient être utilisés comme marqueurs de la résistance aux antibiotiques. Pour cela, il fallait étudier s'il y avait un lien entre résistance acquise aux antibiotiques et présence d'IR.

Dans l'étude décrite précédemment sur le portage digestif des IR dans 2 groupes de sujet, le lien entre résistance aux antibiotiques et présence d'IR a été évalué pour les entérobactéries. Bien qu'analysées séparément, les données colligées à partir des entérobactéries isolées des 2 groupes de patients sont quasi-identiques. Le lien IR – multirésistance, définie dans notre étude comme la résistance acquise à au moins 3 des antibiotiques testés, était significative avec 20 % de multirésistance parmi les entérobactéries *intI-* versus plus de 90 % de multirésistance parmi les entérobactéries *intI+*. Les données ont montré une association forte entre la résistance à certains

antibiotiques et les IR, notamment en ce qui concerne les aminosides (parmi les entérobactéries résistantes à la spectinomycine, 75,5 % étaient *intI+* ; ce chiffre était de 82,9 % pour la résistance à la tobramycine, de 82,4 % pour la résistance à la nétilmicine et de 86,4 % pour la résistance à la gentamicine) ; il en était de même pour la résistance au triméthoprime (88,5 % de souches *intI+*) et au cotrimoxazole (87,8 % de souches *intI+*). Cette relation paraît concordante avec les cassettes classiquement retrouvées chez les IR : *dfr*, *aad*, *aac*... et est conforme aux données de la littérature [211, 214]. Bien que non expliqué par des cassettes, la prévalence constatée d'IR parmi les entérobactéries non *E. coli* résistantes aux fluoroquinolones étaient de 78,6 %. Sur un plan statistique qui prend en compte l'ensemble des souches testées, le lien présence d'IR – résistance aux antibiotiques était significatif pour plusieurs antibiotiques : les pénicillines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, les aminosides, le triméthoprime, le sulfaméthoxazole, le cotrimoxazole, les quinolones et fluoroquinolones, la tétracycline et le chloramphénicol ( $p < 0,05$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés par Leverstein-van Hall et collaborateurs [211]. Une donnée intéressante que notre étude met en évidence est la différence entre *E. coli* et les autres entérobactéries : le lien IR – résistance aux antibiotiques est beaucoup plus fort et significatif pour les entérobactéries non *E. coli* ; de plus certains antibiotiques tels que les C3G sont associés de façon significative aux IR, alors qu'ils ne le sont pas avec l'espèce *E. coli*. Ce résultat doit être pris avec beaucoup de prudence et nécessitera d'être confirmé étant donné les très faibles effectifs de souches résistantes aux C3G.

Les différences de prévalence constatées entre les 2 groupes étaient significatives pour ce qui concerne les chiffres issus des selles (43,6 % dans le Groupe 1 *versus* 53,2 % dans le Groupe 2,  $p = 0,035$ ). Ces chiffres, contrairement à ceux issus des

bouillons d'enrichissement et de la culture conventionnelle, sont les plus représentatifs de la quantité réelle d'IR initialement présente dans le tube digestif des individus. Ils iraient dans le sens d'un effet de la pression de sélection antibiotique sur le portage digestif des IR, malgré différents biais de l'étude (Groupe 1 personnel de l'hôpital et donc peut-être plus à risque de portage de bactéries résistantes et Groupe 2 non homogène). Cependant, la quantification des IR de classe 1 a montré, au sein des sujets porteurs, que le nombre de copies d'IR de classe 1 par gramme de selle était équivalent entre les individus des deux groupes. Ces données devront être confirmées et affinées avec un plus grand nombre de sujets en recueillant de façon précise la prise d'antibiotiques.

Par ailleurs, l'étude menée ici était une photographie à un instant  $t$  ; il serait intéressant de réaliser une cinétique du portage en IR sur plusieurs mois chez des individus pour lesquels il est possible de recueillir facilement des échantillons de selles ainsi que les traitements antibiotiques administrés, comme par exemple les sujets hospitalisés en gériatrie.

L'objectif de la seconde étude chez l'homme, protocole « Hemotion », était d'évaluer la valeur prédictive du marqueur IR par rapport à la résistance aux antibiotiques de BGN isolées de flacons d'hémoculture. Afin de se mettre dans les conditions les plus réelles, à même d'évaluer la prédictivité du marqueur IR, nous avons réalisé la détection des IR à la fois à partir des BGN mais aussi directement à partir des flacons d'hémoculture positifs à BGN. Les antibiotiques testés et retenus pour l'analyse

ont été ceux utilisés dans la pratique clinique, streptomycine, spectinomycine, tétracycline et chloramphénicol par exemple ont été exclus.

Les BGN isolés lors de cette étude étaient, contrairement à l'étude précédente de portage, des germes isolés en situation pathogène. Les entérobactéries représentaient la très large majorité des BGN (81,7 %), *E. coli* était toujours l'espèce majoritaire au sein de la famille (54,7 % des entérobactéries, 44,7 % des BGN totaux). Les entérobactéries isolées étaient globalement plus résistantes aux antibiotiques que celles isolées lors de l'étude sur le portage digestif. Ces données démographiques sont le reflet de l'épidémiologie microbienne moyenne retrouvée au CHU de Limoges ; elles ne sont donc pas directement transposables aux autres centres hospitaliers, même si globalement les résistances sont proches. Le rapport de l'ONERBA en 2008 ([http://www.onerba.org/IMG/pdf/onerba\\_rapport2008\\_LD.pdf](http://www.onerba.org/IMG/pdf/onerba_rapport2008_LD.pdf)) donne ainsi des niveaux de résistance proches (réseau AZAY-résistance 2007) avec par exemple pour les *E. coli* isolés d'hémoculture, une résistance à l'amoxicilline de 62,2 % (62,9 % dans notre étude), aux C3G de 4,9 % (3,8 %), à la gentamicine de 6,0 % (10,5 %), à la ciprofloxacine de 14,4 % (20,0 %) et au cotrimoxazole de 39,8 % (31,4 %).

La prévalence des IR au sein des entérobactéries était importante, 27,6 % dont plus d'un tiers d'*E. coli* porteur (36,2 %), soit des valeurs supérieures aux études les plus anciennes [139, 140] mais plus proches des études les plus récentes, 40 % par exemple dans cette étude espagnole s'intéressant aux *E. coli* isolés d'hémocultures [141]. Ces comparaisons sont néanmoins très difficiles à faire et à considérer avec prudence étant donné les niveaux de résistance globaux des bactéries isolées qui ne sont pas les mêmes, ce d'autant que les antibiotiques testés ne sont pas non plus les mêmes ;

en outre, elles dépendent de l'origine des patients inclus dans les études (type de pathologie, service d'hospitalisation...).

Concernant le lien entre les IR et la résistance aux antibiotiques, alors qu'il s'agit d'une étude différente de celle concernant le portage digestif, nous retrouvons des résultats très comparables. Tout d'abord, le lien IR – multirésistance est à nouveau très significatif alors même que les critères de définition de la multirésistance dans cette étude (résistance acquise à au moins 3 des antibiotiques testés) étaient plus stringents étant donné le nombre moindre d'antibiotiques testés (seulement 16) : parmi les entérobactéries *intI*<sup>-</sup>, 26,6 % étaient multirésistantes *versus* 86,8 % parmi les *intI*<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) ; la différence était encore plus importante pour les entérobactéries non *E. coli* (20,8 % *versus* 86,7 %). De façon là aussi très comparable aux résultats de l'étude sur le portage digestif, parmi les souches résistantes aux antibiotiques, les souches *intI*<sup>+</sup> étaient majoritaires pour ce qui concerne la résistance aux aminosides (environ 70 % selon les molécules), à la ciprofloxacine (70,7 %) et au cotrimoxazole (93,6 %) avec des pourcentages encore plus importants pour les entérobactéries non *E. coli*. Sur le plan statistique qui prend en compte l'ensemble des souches testées, le lien présence d'IR – résistance aux antibiotiques était significatif pour les mêmes antibiotiques que ceux retrouvés dans l'étude sur le portage digestif, à savoir les pénicillines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, les aminosides, les quinolones et fluoroquinolones et le cotrimoxazole ( $p < 0,05$ ). La distinction entre l'espèce *E. coli* et les autres entérobactéries a conduit aux mêmes conclusions, à savoir que la résistance aux C3G n'était liée aux IR de façon significative que pour les entérobactéries non *E. coli*, tout comme la résistance acquise aux aminosides qui n'était significative chez *E. coli* que pour la tobramycine alors qu'elle l'était pour l'ensemble des aminosides chez les autres entérobactéries. De la

même façon que dans l'étude sur le portage, ces données sont à prendre avec prudence en raison des effectifs et devront être confirmées par d'autres études. Dans cette étude, l'analyse a été poussée plus loin en tenant compte des phénotypes de résistance acquis. Nous avons pu mettre en évidence que la significativité du lien entre IR et résistance aux  $\beta$ -lactamines n'était en fait pas lié au même phénotype chez *E. coli* et chez les autres entérobactéries ; pour *E. coli*, le lien était significatif seulement par le phénotype « pénicillinase bas niveau » alors que pour les autres entérobactéries, le lien était dû uniquement au phénotype BLSE. Le fait que certaines résistances acquises, comme par exemple la résistance aux fluoroquinolones, soient associées de façon significative aux IR ne peut pas être expliqué par le seul réseau de cassettes des IR. Au-delà du pool de cassettes qu'ils peuvent héberger, les IR doivent être considérés, de façon plus générale, comme des marqueurs d'acquisition de matériel génétique. Il faut garder à l'esprit que les IR sont portés par des plasmides ou transposons qui, indépendamment du système IR qu'ils portent, peuvent eux aussi héberger d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. L'argument en faveur de cette explication est la prédominance au sein des IR des cassettes *dfr* et *aad* qui confèrent respectivement une résistance au triméthoprim et à la streptomycine/spectinomycine alors même que les souches sont multirésistantes vis-à-vis d'autres antibiotiques tels que d'autres aminosides ou des  $\beta$ -lactamines [139, 142].

Concernant la valeur prédictive du marqueur IR, nous avons pu montrer grâce à cette étude que les VPP ne constituaient pas un outil très intéressant, la plupart des pourcentages étant cantonnés à des valeurs inférieures à 90 %. Seules les VPP mesurées chez les entérobactéries non *E. coli* vis-à-vis des quinolones, des fluoroquinolones et du cotrimoxazole étaient importantes (93,3 % chacune). *A contrario*, le calcul des VPN a

montré des résultats particulièrement intéressants dans un objectif futur d'utilisation du marqueur IR. En effet, les VPN calculées chez les entérobactéries vis-à-vis des aminosides, des fluoroquinolones et du cotrimoxazole étaient toutes supérieures à 90 %, voire même 95 % pour certaines molécules. En outre, pour l'espèce *E. coli*, les VPN vis-à-vis des C3G étaient de 97 %. Les C3G étant utilisées en première intention dans le traitement des bactériémies à BGN, cette forte VPN laisse augurer d'un potentiel du marqueur IR lorsque celui-ci est détecté négatif. Des études complémentaires sur un plus grand nombre de souches seront bien entendu nécessaires, mais la détection des IR pourrait s'avérer être particulièrement intéressante à l'heure où les autorités demandent un bon usage des antibiotiques en raison d'un arsenal thérapeutique qui ne progresse pas alors même que nous sommes confrontés à l'émergence grandissante de souches multirésistantes [267].

Dans ce contexte, le caractère prédictif du marqueur IR n'a d'ailleurs d'intérêt que si celui-ci est utilisé directement à partir de liquides biologiques, avant même que la culture bactérienne n'ait été obtenue. L'emploi de la qPCR directement à partir des flacons d'hémoculture était une première étape afin de savoir si cette technique développée était suffisamment sensible. Sans réaliser d'extraction de l'échantillon, avec une simple dilution au 1/100<sup>ème</sup> du mélange sang / bactéries, nous avons obtenu un résultat très encourageant avec une concordance dans la détection des IR de 98,5 % par rapport à la culture des BGN, soit seulement 3 résultats discordants sur 205. A noter que l'un des résultats obtenus à partir des flacons n'est en fait pas une discordance puisqu'il a permis de détecter un IR alors même qu'aucun IR n'avait été trouvé à partir des 4 BGN isolées du flacon ; la mise en culture *a posteriori* du flacon a permis d'identifier un BGN *intI+* non détecté initialement.

La détection des IR avait déjà été mise à profit par plusieurs équipes comme un outil épidémiologique employé, en association avec d'autres techniques de génotypage, pour « typer », notamment *via* le réseau de cassettes, des clones épidémiques d'*Acinetobacter*, de *Pseudomonas* ou d'entérobactéries porteuses d'IR ou encore pour identifier une origine commune de contamination [105, 268, 269]. Le protocole Hemotion constitue une première étape, une preuve de concept, de l'utilisation du marqueur IR comme un outil diagnostique de détection précoce des résistances ; il présente aussi comme intérêt d'être un test unique plus simple à mettre en œuvre qu'une multitude de PCR ciblant les centaines de gènes de résistance aux antibiotiques décrits chez les BGN, PCRs qu'il serait quasi-impossible à appliquer en routine, qui plus est à partir de liquides biologiques. Afin de franchir une étape supplémentaire qui pourrait conduire à une aide à la prise en charge thérapeutique des patients et à un usage rationnel des antibiotiques, un projet de recherche clinique nommé IRIS (Intérêt de la Recherche des Intégrons dans le Sepsis) va débiter ; il sera plus proche de la « vraie vie » et visera à évaluer la valeur prédictive du marqueur IR directement à partir de liquides biologiques recueillis chez des patients en Sepsis sévère ou choc septique à point de départ urinaire ou digestif (en raison de la forte prévalence des IR dans ces pathologies). Ce projet IRIS vient d'être accepté à l'appel d'offre recherche translationnelle Inserm-DGOS 2012.

# Conclusion

Malgré une découverte datant de plus de 20 ans, les intégrons de résistance constituent un support génétique de résistance aux antibiotiques qui recèle encore de nombreux secrets. Sa plateforme fonctionnelle concentre en seulement quelques centaines de nucléotides des systèmes complexes de régulation et d'expression des gènes de cassettes et du gène de l'intégrase, qui, assurent un équilibre fin entre force d'expression des gènes de cassettes et capacités de recombinaison de l'intégrase. La pression de sélection antibiotique agit sur cet équilibre ; les effets de celle-ci, constatés dans ce travail de thèse, ont montré une autre facette du système, cette fois dans son adaptabilité à l'environnement extérieur. Il n'en reste pas moins que ces essais ont été menés dans des conditions planctoniques de laboratoire et qu'ils ne reflètent pas forcément ce qu'il peut se passer dans la « vraie vie » ; ils nécessiteront d'être transposés à d'autres modèles plus proches de la réalité, comme par exemple au sein d'un biofilm ou dans un modèle murin.

Le rôle et la présence des IR dans l'environnement en général et dans le portage digestif en particulier restent des paramètres encore mal explorés. Le lien entre la pression de sélection antibiotique et le portage digestif de bactéries multirésistantes (BMR) a déjà été démontré par plusieurs études conduisant aujourd'hui à un dépistage quasi-systématique des BMR chez les patients hospitalisés dans les USI [270, 271]. Etant donné le lien fort démontré entre les IR et la multirésistance aux antibiotiques, il semble judicieux de poursuivre les études menées sur le portage digestif des IR en les élargissant à d'autres populations tout en les agrémentant d'un aspect dynamique.

## Références bibliographiques

---

- [1] Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989;3:1669-83.
- [2] Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995;15:593-600.
- [3] Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, *et al.* Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol* 2007;15:301-9.
- [4] Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet* 2010;44:141-66.
- [5] Naas T, Mikami Y, Imai T, *et al.* Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol* 2001;183:235-49.
- [6] Nunes-Duby SE, Kwon HJ, Tirumalai RS, *et al.* Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res* 1998;26:391-406.
- [7] Hansson K, Sundstrom L, Pelletier A, *et al.* IntI2 integron integrase in *Tn7*. *J Bacteriol* 2002;184:1712-21.
- [8] Hall RM, Collis CM, Kim MJ, *et al.* Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci* 1999;870:68-80.
- [9] Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, *et al.* Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol* 1998;29:477-90.
- [10] Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, *et al.* Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology* 2000;146:2855-64.
- [11] Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, *et al.* Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Mol Microbiol* 2002;46:1415-27.
- [12] Ploy MC, Courvalin P, Lambert T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2557-63.
- [13] Levesque C, Brassard S, Lapointe J, *et al.* Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene* 1994;142:49-54.
- [14] Jove T, Da Re S, Denis F, *et al.* Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet* 2010;6:e1000793.
- [15] Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, *et al.* A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1612-5.
- [16] Correia M, Boavida F, Grosso F, *et al.* Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2838-43.
- [17] da Fonseca EL, dos Santos Freitas F, Vicente AC. Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:797-801.
- [18] Collis CM, Hall RM. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* 1992;6:2875-85.

- [19] Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, *et al.* Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33:757-84.
- [20] Bissonnette L, Roy PH. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1992;174:1248-57.
- [21] Moura A, Soares M, Pereira C, *et al.* INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 2009;25:1096-8.
- [22] Joss MJ, Koenig JE, Labbate M, *et al.* ACID: annotation of cassette and integron data. *BMC Bioinformatics* 2009;10:118.
- [23] Ramirez MS, Quiroga C, Centron D. Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5179-81.
- [24] Biskri L, Mazel D. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3326-31.
- [25] Ramirez MS, Pineiro S, Centron D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:699-706.
- [26] Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, *et al.* PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996;34:2909-13.
- [27] Hall RM, Brookes DE, Stokes HW. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol* 1991;5:1941-59.
- [28] Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, *et al.* Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 1997;26:731-45.
- [29] Bouvier M, Demarre G, Mazel D. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J* 2005;24:4356-67.
- [30] Johansson C, Boukharta L, Eriksson J, *et al.* Mutagenesis and Homology Modeling of the *Tn21* Integron Integrase IntI1 (dagger). *Biochemistry* 2009;48:1743-53.
- [31] Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, *et al.* Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* 2002;184:3017-26.
- [32] Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, *et al.* The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:761-8.
- [33] Ploy MC, Giamarellou H, Bourlioux P, *et al.* Detection of *aac(6')-I* genes in amikacin-resistant *Acinetobacter* spp. by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2925-8.
- [34] Betteridge T, Partridge SR, Iredell JR, *et al.* Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3939-43.
- [35] Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 1992;174:1574-85.
- [36] Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, *et al.* Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* 1993;9:41-52.
- [37] Collis CM, Recchia GD, Kim MJ, *et al.* Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. *J Bacteriol* 2001;183:2535-42.

- [38] Frumerie C, Ducos-Galand M, Gopaul DN, *et al.* The relaxed requirements of the integron cleavage site allow predictable changes in integron target specificity. *Nucleic Acids Res* 2010;38:559-69.
- [39] Bouvier M, Ducos-Galand M, Loot C, *et al.* Structural features of single-stranded integron cassette *attC* sites and their role in strand selection. *PLoS Genet* 2009;5:e1000632.
- [40] Demarre G, Frumerie C, Gopaul DN, *et al.* Identification of key structural determinants of the IntI1 integron integrase that influence *attC* x *attII* recombination efficiency. *Nucleic Acids Res* 2007;35:6475-89.
- [41] MacDonald D, Demarre G, Bouvier M, *et al.* Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature* 2006;440:1157-62.
- [42] Francia MV, Zabala JC, de la Cruz F, *et al.* The IntI1 integron integrase preferentially binds single-stranded DNA of the *attC* site. *J Bacteriol* 1999;181:6844-9.
- [43] Larouche A, Roy PH. Effect of *attC* structure on cassette excision by integron integrases. *Mob DNA* 2011;2:3.
- [44] Johansson C, Kamali-Moghaddam M, Sundstrom L. Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Res* 2004;32:4033-43.
- [45] Dubois V, Parizano MP, Arpin C, *et al.* High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1333-40.
- [46] Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, *et al.* The SOS response controls integron recombination. *Science* 2009;324:1034.
- [47] Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, *et al.* Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob DNA* 2011;2:6.
- [48] Erill I, Campoy S, Barbe J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:637-56.
- [49] Guerin E, Cambray G, Da Re S, *et al.* [The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons]. *Med Sci (Paris)* 2010;26:28-30.
- [50] Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet* 2010;6:e1001165.
- [51] Papagiannitsis CC, Tzouveleki LS, Miriagou V. Relative strengths of the class 1 integron promoter hybrid 2 and the combinations of strong and hybrid 1 with an active p2 promoter. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:277-80.
- [52] Guerin E, Jove T, Tabesse A, *et al.* High-Level Gene Cassettes Transcription Prevents Integrase Expression in Class 1 Integrons. *J Bacteriol* 2011;193:5675-82.
- [53] Wei Q, Jiang X, Li M, *et al.* Transcription of integron-harboured gene cassette impacts integration efficiency in class 1 integron. *Mol Microbiol* 2011;80:1326-36.
- [54] Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:155-62.
- [55] Jacquier H, Zaoui C, Sanson-le Pors MJ, *et al.* Translation regulation of integrons gene cassette expression by the *attC* sites. *Mol Microbiol* 2009;72:1475-86.
- [56] Hanau-Bercot B, Podglajen I, Casin I, *et al.* An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol Microbiol* 2002;44:119-30.
- [57] Lichtenstein C, Brenner S. Unique insertion site of *Tn7* in the *E. coli* chromosome. *Nature* 1982;297:601-3.

- [58] Wolkow CA, DeBoy RT, Craig NL. Conjugating plasmids are preferred targets for *Tn7*. *Genes Dev* 1996;10:2145-57.
- [59] Barlow RS, Gobius KS. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1133-8.
- [60] Marquez C, Labbate M, Ingold AJ, *et al.* Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:4153-4.
- [61] Rodriguez-Minguela CM, Apajalahti JH, Chai B, *et al.* Worldwide prevalence of class 2 integrases outside the clinical setting is associated with human impact. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:5100-10.
- [62] Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, *et al.* A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1594-8.
- [63] Shibata N, Doi Y, Yamane K, *et al.* PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003;41:5407-13.
- [64] Xu H, Davies J, Miao V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J Bacteriol* 2007;189:6276-83.
- [65] Moura A, Henriques I, Smalla K, *et al.* Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol* 2010;161:58-66.
- [66] Barkovskii AL, Green C, Hurley D. The occurrence, spatial and temporal distribution, and environmental routes of tetracycline resistance and integrase genes in *Crassostrea virginica* beds. *Mar Pollut Bull* 2010;60:2215-24.
- [67] Stokes HW, Tomaras C, Parsons Y, *et al.* The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid* 1993;30:39-50.
- [68] Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70:296-316.
- [69] Valverde A, Canton R, Galan JC, *et al.* In117, an unusual In0-like class 1 integron containing CR1 and *bla*(CTX-M-2) and associated with a *Tn21*-like element. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:799-802.
- [70] Verdet C, Arlet G, Barnaud G, *et al.* A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*(DHA-1) gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:222-5.
- [71] Partridge SR, Hall RM. In34, a complex In5 family class 1 integron containing *orf513* and *dfrA10*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:342-9.
- [72] Garnier F, Raked N, Gassama A, *et al.* Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sull*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3200-2.
- [73] Ploy MC, Denis F, Courvalin P, *et al.* Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2684-8.
- [74] Tsakris A, Ikonomidis A, Spanakis N, *et al.* Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase and *satI* gene, from *Morganella morganii*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:739-41.
- [75] Sajjad A, Holley MP, Labbate M, *et al.* Preclinical class 1 integron with a complete *Tn402*-like transposition module. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:335-7.

- [76] Gassama A, Aidara-Kane A, Chainier D, *et al.* Integron-associated antibiotic resistance in enteroaggregative and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* 2004;10:27-30.
- [77] Poirel L, Naas T, Guibert M, *et al.* Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:573-81.
- [78] Machado E, Canton R, Baquero F, *et al.* Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1823-9.
- [79] Skurnik D, Le Menac'h A, Zurakowski D, *et al.* Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3062-5.
- [80] Poirel L, Le Thomas I, Naas T, *et al.* Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:622-32.
- [81] Preston KE, Radomski CC, Venezia RA. The cassettes and 3' conserved segment of an integron from *Klebsiella oxytoca* plasmid pACM1. *Plasmid* 1999;42:104-14.
- [82] Perilli M, Mezzatesta ML, Falcone M, *et al.* Class I integron-borne bla(VIM-1) carbapenemase in a strain of *Enterobacter cloacae* responsible for a case of fatal pneumonia. *Microb Drug Resist* 2008;14:45-7.
- [83] Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Tsakris A, *et al.* IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2247-53.
- [84] Jeong SH, Lee K, Chong Y, *et al.* Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:397-400.
- [85] Yum JH, Yong D, Lee K, *et al.* A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:217-9.
- [86] Bagattini M, Crispino M, Gentile F, *et al.* A nosocomial outbreak of *Serratia marcescens* producing inducible Amp C-type beta-lactamase enzyme and carrying antimicrobial resistance genes within a class 1 integron. *J Hosp Infect* 2004;56:29-36.
- [87] Gassama-Sow A, Aidara-Kane A, Raked N, *et al.* Integrons in *Salmonella* Keurmassar, Senegal. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1339-41.
- [88] Ploy MC, Chainier D, Tran Thi NH, *et al.* Integron-associated antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi from Asia. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1427-9.
- [89] Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, *et al.* Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis* 2009;15:388-96.
- [90] Rodriguez I, Rodicio MR, Mendoza MC, *et al.* Large conjugative plasmids from clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-associated drug resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1603-7.
- [91] Casin I, Breuil J, Brisabois A, *et al.* Multidrug-resistant human and animal *Salmonella* Typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamase PSE-1. *J Infect Dis* 1999;179:1173-82.

- [92] Oh JY, Yu HS, Kim SK, *et al.* Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from southwestern Korea during epidemic periods. *J Clin Microbiol* 2003;41:421-3.
- [93] Pan JC, Ye R, Meng DM, *et al.* Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:288-96.
- [94] Gassama-Sow A, Diallo MH, Boye CS, *et al.* Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:267-70.
- [95] Gassama Sow A, Diallo MH, Gatet M, *et al.* Description of an unusual class 2 integron in *Shigella sonnei* isolates in Senegal (sub-Saharan Africa). *J Antimicrob Chemother* 2008;62:843-4.
- [96] Ke X, Gu B, Pan S, *et al.* Epidemiology and molecular mechanism of integron-mediated antibiotic resistance in *Shigella*. *Arch Microbiol* 2011;193:767-74.
- [97] Naas T, Benaoudia F, Massuard S, *et al.* Integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:703-11.
- [98] Soto SM, Lobato MJ, Mendoza MC. Class 1 integron-borne gene cassettes in multidrug-resistant *Yersinia enterocolitica* strains of different phenotypic and genetic types. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:421-6.
- [99] Ferreira S, Paradela A, Velez J, *et al.* Carriage of *qnrA1* and *qnrB2*, *bla*(CTX-M15), and complex class 1 integron in a clinical multiresistant *Citrobacter freundii* isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67:188-90.
- [100] Dubois V, Poirel L, Marie C, *et al.* Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla*(GES-1) and a fused product of *aac3-Ib/aac6'-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:638-45.
- [101] Naas T, Poirel L, Karim A, *et al.* Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 1999;176:411-9.
- [102] Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, *et al.* Characterization of acquired beta-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:530-6.
- [103] Ruiz-Martinez L, Lopez-Jimenez L, Fuste E, *et al.* Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:398-402.
- [104] Ruiz J, Navia MM, Casals C, *et al.* Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:907-11.
- [105] Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, *et al.* Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2005;43:3074-82.
- [106] Barbolla R, Catalano M, Orman BE, *et al.* Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:666-9.
- [107] Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, *et al.* Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerg Infect Dis* 2007;13:559-65.

- [108] Ramirez MS, Vargas LJ, Cagnoni V, *et al.* Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4418-20.
- [109] Amita, Chowdhury SR, Thungapathra M, *et al.* Class I integrons and SXT elements in El Tor strains isolated before and after 1992 *Vibrio cholerae* O139 outbreak, Calcutta, India. *Emerg Infect Dis* 2003;9:500-2.
- [110] Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, *et al.* New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2493-9.
- [111] Ahmed AM, Kawaguchi F, Shimamoto T. Class 2 integrons in *Vibrio cholerae*. *J Med Microbiol* 2006;55:643-4.
- [112] Rajpara N, Patel A, Tiwari N, *et al.* Mechanism of drug resistance in a clinical isolate of *Vibrio fluvialis*: involvement of multiple plasmids and integrons. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:220-5.
- [113] Schmidt AS, Bruun MS, Larsen JL, *et al.* Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:735-43.
- [114] L'Abée-Lund TM, Sorum H. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microb Drug Resist* 2001;7:263-72.
- [115] Chang YC, Shih DY, Wang JY, *et al.* Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59:191-7.
- [116] Lee MD, Sanchez S, Zimmer M, *et al.* Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3660-4.
- [117] van Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K, *et al.* Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:746-50.
- [118] Crespo O, Catalano M, Pineiro S, *et al.* Tn7 distribution in *Helicobacter pylori*: a selective paradox. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:341-4.
- [119] Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S. Molecular basis of resistance to trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica*. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:485-90.
- [120] Kadlec K, Wiegand I, Kehrenberg C, *et al.* Studies on the mechanisms of beta-lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:396-402.
- [121] Martin C, Timm J, Rauzier J, *et al.* Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature* 1990;345:739-43.
- [122] Nesvera J, Hochmannova J, Patek M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 1998;169:391-5.
- [123] Tauch A, Gotker S, Puhler A, *et al.* The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid* 2002;48:117-29.

- [124] Liu MC, Wu CM, Liu YC, *et al.* Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of *Arcanobacterium pyogenes* in bovine endometritis. *J Dairy Sci* 2009;92:3659-66.
- [125] Zhao KL, Liu Y, Zhang XY, *et al.* Detection and characterization of antibiotic resistance genes in *Arcanobacterium pyogenes* strains from abscesses of forest musk deer. *J Med Microbiol* 2011;60(Pt12):1820-6.
- [126] Agero Y, Sandvang D. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:7941-7.
- [127] Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, *et al.* Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7118-22.
- [128] Clark NC, Olsvik O, Swenson JM, *et al.* Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:157-60.
- [129] Shi L, Zheng M, Xiao Z, *et al.* Unnoticed spread of class 1 integrons in gram-positive clinical strains isolated in Guangzhou, China. *Microbiol Immunol* 2006;50:463-7.
- [130] Xu Z, Shi L, Alam MJ, *et al.* Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001-2004. *FEMS Microbiol Lett* 2008;278:223-30.
- [131] Xu Z, Shi L, Zhang C, *et al.* Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:980-4.
- [132] Xu Z, Li L, Alam MJ, *et al.* First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 2008;57:264-8.
- [133] Xu Z, Li L, Shirliff ME, *et al.* Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001-2006. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:714-8.
- [134] Xu Z, Li L, Shirliff ME, *et al.* First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:315-7.
- [135] Jin Y, Ling JM. Prevalence of integrons in antibiotic-resistant *Salmonella* spp. in Hong Kong. *Jpn J Infect Dis* 2009;62:432-9.
- [136] Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, *et al.* High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Jpn J Infect Dis* 2010;63:417-21.
- [137] Navia MM, Ruiz J, Vila J. Molecular characterization of the integrons in *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:175-9.
- [138] Jin YH, Oh YH, Jung JH, *et al.* Antimicrobial resistance patterns and characterization of integrons of *Shigella sonnei* isolates in Seoul, 1999-2008. *J Microbiol* 2010;48:236-42.
- [139] Heir E, Lindstedt BA, Leegaard TM, *et al.* Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004;3:12.

- [140] Schmitz FJ, Hafner D, Geisel R, *et al.* Increased prevalence of class I integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Enterobacter* species isolates over a 7-year period in a German university hospital. *J Clin Microbiol* 2001;39:3724-6.
- [141] Vinue L, Saenz Y, Rojo-Bezares B, *et al.* Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:492-6.
- [142] White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2658-61.
- [143] Yu HS, Lee JC, Kang HY, *et al.* Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol* 2003;41:5429-33.
- [144] Leverstein-Van Hall MA, Paauw A, Box AT, *et al.* Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol* 2002;40:3038-40.
- [145] Vasilakopoulou A, Psychogiou M, Tzouveleki L, *et al.* Prevalence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* of poultry and human origin. *Foodborne Pathog Dis* 2009;6:1211-8.
- [146] Vinue L, Saenz Y, Somalo S, *et al.* Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:934-7.
- [147] Sepp E, Stsepetova J, Loivukene K, *et al.* The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009;8:34.
- [148] Skurnik D, Bonnet D, Bernede-Bauduin C, *et al.* Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. *Environ Microbiol* 2008;10:2132-7.
- [149] Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, *et al.* Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:723-6.
- [150] Duijkeren EV, Box AT, Schellen P, *et al.* Class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from clinical infections of horses and dogs in the Netherlands. *Microb Drug Resist* 2005;11:383-6.
- [151] Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, *et al.* Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. *Vet Microbiol* 2007;124:248-55.
- [152] Diaz MA, Cooper RK, Cloeckaert A, *et al.* Plasmid-mediated high-level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtles in Louisiana. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:306-12.
- [153] Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, *et al.* Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:6686-90.
- [154] Dolejska M, Cizek A, Literak I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *J Appl Microbiol* 2007;103:11-9.
- [155] Petersen A, Guardabassi L, Dalsgaard A, *et al.* Class I integrons containing a *dhfrI* trimethoprim resistance gene cassette in aquatic Acinetobacter spp. *FEMS Microbiol Lett* 2000;182:73-6.

- [156] Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol* 2007;114:295-306.
- [157] Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, *et al.* Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:5675-82.
- [158] Cocchi S, Grasselli E, Gutacker M, *et al.* Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50:126-32.
- [159] Shaheen BW, Oyarzabal OA, Boothe DM. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical *E. coli* isolates from the US. *Vet Microbiol* 2010;144:363-70.
- [160] Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, *et al.* Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1215-9.
- [161] Diaz-Mejia JJ, Amabile-Cuevas CF, Rosas I, *et al.* An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiology* 2008;154:94-102.
- [162] Vali L, Hamouda A, Hoyle DV, *et al.* Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* O26, O103 and O145 shed by two cohorts of Scottish beef cattle. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:403-10.
- [163] Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, *et al.* Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:838-42.
- [164] Rao S, Maddox CW, Hoiem-Dalen P, *et al.* Diagnostic accuracy of class 1 integron PCR method in detection of antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from swine production systems. *J Clin Microbiol* 2008;46:916-20.
- [165] Sunde M, Sorum H. Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 1999;5:279-87.
- [166] Roe MT, Byrd JA, Smith DP, *et al.* Class 1 and class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments. *J Food Prot* 2003;66:1426-31.
- [167] Yang H, Chen S, White DG, *et al.* Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol* 2004;42:3483-9.
- [168] Liebana E, Clouting C, Cassar CA, *et al.* Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. *J Clin Microbiol* 2002;40:1481-6.
- [169] Guerra B, Junker E, Schroeter A, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:489-92.
- [170] Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, *et al.* Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:208-16.

- [171] Lapierre L, Cornejo J, Borie C, *et al.* Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. *Microb Drug Resist* 2008;14:265-72.
- [172] Futagawa-Saito K, Okatani AT, Sakurai-Komada N, *et al.* Epidemiological characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from healthy pigs in Japan. *J Vet Med Sci* 2010;72:61-6.
- [173] Kang HY, Jeong YS, Oh JY, *et al.* Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:639-44.
- [174] Kang SG, Lee DY, Shin SJ, *et al.* Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. *J Vet Sci* 2005;6:201-5.
- [175] White DG, Zhao S, Sudler R, *et al.* The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. *N Engl J Med* 2001;345:1147-54.
- [176] Chen S, Zhao S, White DG, *et al.* Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:1-7.
- [177] Miko A, Pries K, Schroeter A, *et al.* Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1025-33.
- [178] Sunde M. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1019-24.
- [179] Soufi L, Abbassi MS, Saenz Y, *et al.* Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis* 2009;6:1067-73.
- [180] Khaita ML, Oloya J, Doetkott D, *et al.* Antimicrobial resistance and association with class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from turkey meat products. *J Food Prot* 2008;71:1679-84.
- [181] Antunes P, Machado J, Sousa JC, *et al.* Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella* Typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:429-34.
- [182] Rosser SJ, Young HK. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:11-8.
- [183] Ozgumus OB, Sandalli C, Sevim A, *et al.* Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. *J Microbiol* 2009;47:19-27.
- [184] Laroche E, Pawlak B, Berthe T, *et al.* Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol* 2009;68:118-30.
- [185] Henriques IS, Fonseca F, Alves A, *et al.* Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res Microbiol* 2006;157:938-47.
- [186] Mukherjee S, Chakraborty R. Incidence of class 1 integrons in multiple antibiotic-resistant Gram-negative copiotrophic bacteria from the River Torsa in India. *Res Microbiol* 2006;157:220-6.

- [187] Chen B, Zheng W, Yu Y, *et al.* Class 1 integrons, selected virulence genes, and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from the Minjiang River, Fujian Province, China. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:148-55.
- [188] Roe MT, Vega E, Pillai SD. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis* 2003;9:822-6.
- [189] Chen H, Shu W, Chang X, *et al.* The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing. *Environ Pollut* 2010;158:2459-64.
- [190] Hardwick SA, Stokes HW, Findlay S, *et al.* Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2008;278:207-12.
- [191] Zhang X, Wu B, Zhang Y, *et al.* Class 1 integronase gene and tetracycline resistance genes *tetA* and *tetC* in different water environments of Jiangsu Province, China. *Ecotoxicology* 2009;18:652-60.
- [192] Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, *et al.* Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J* 2008;2:417-28.
- [193] Rosewarne CP, Pettigrove V, Stokes HW, *et al.* Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;72:35-46.
- [194] Stokes HW, Nesbo CL, Holley M, *et al.* Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *J Bacteriol* 2006;188:5722-30.
- [195] Koenig JE, Sharp C, Dlutek M, *et al.* Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: the case of the Sydney tar ponds. *PLoS One* 2009;4:e5276.
- [196] Gillings MR, Holley MP, Stokes HW. Evidence for dynamic exchange of *qac* gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 2009;296:282-8.
- [197] Gillings MR, Krishnan S, Worden PJ, *et al.* Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS Microbiol Lett* 2008;287:56-62.
- [198] Gillings M, Boucher Y, Labbate M, *et al.* The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol* 2008;190:5095-100.
- [199] Guillemot D. Risque collectif lié à l'antibiothérapie. Actualité et dossier en santé publique - Revue de l'HCSP 1999;27:38-41.
- [200] Guillemot D, Leclercq R. [Impact of population exposure on the risk of bacterial resistance]. *Med Mal Infect* 2005;35 Suppl 3:S212-20.
- [201] Wise R. Antimicrobial resistance: priorities for action. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:585-6.
- [202] Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, *et al.* Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005;365:579-87.
- [203] van de Sande-Bruinsma N, Grundmann H, Verloo D, *et al.* Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1722-30.

- [204] Andremont A. Pression de sélection antibiotique, flores commensales et évolution de la résistance. *Journal de Pédiatrie et de puériculture* 2002;3:160-5.
- [205] Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009;64 Suppl 1:i3-10.
- [206] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:75-81.
- [207] Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* 2009;75:417-34.
- [208] Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. *Chemosphere* 2009;75:435-41.
- [209] Baquero F, Martinez JL, Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:260-5.
- [210] Nijssen S, Florijn A, Top J, *et al.* Unnoticed spread of integron-carrying Enterobacteriaceae in intensive care units. *Clin Infect Dis* 2005;41:1-9.
- [211] Leverstein-van Hall MA, Block HE, Donders AR, *et al.* Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis* 2003;187:251-9.
- [212] Daikos GL, Kosmidis C, Tassios PT, *et al.* Enterobacteriaceae bloodstream infections: presence of integrons, risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2366-72.
- [213] Rao AN, Barlow M, Clark LA, *et al.* Class 1 integrons in resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., US hospitals. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1011-4.
- [214] Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, *et al.* Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:689-96.
- [215] Chang-Tai Z, Yang L, Zhong-Yi H, *et al.* High frequency of integrons related to drug-resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* 2011;29:118-23.
- [216] Lin MF, Chang KC, Yang CY, *et al.* Role of integrons in antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter baumannii*. *Jpn J Infect Dis* 2010;63:440-3.
- [217] Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R, *et al.* Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44:303-9.
- [218] Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M, *et al.* Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol* 2010;161:234-42.
- [219] Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, *et al.* The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:666-72.
- [220] Solberg OD, Ajiboye RM, Riley LW. Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2006;44:1347-51.
- [221] Skurnik D, Lacheeb S, Bernede C, *et al.* Integrons and antibiotic resistance in phylogenetic group B2 *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* 2009;15:173-8.
- [222] Dahmen S, Mansour W, Boujaafar N, *et al.* Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2010;16:43-7.

- [223] Grape M, Farra A, Kronvall G, *et al.* Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:185-92.
- [224] Hu LF, Chang X, Ye Y, *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:230-4.
- [225] Baharoglu Z, Mazel D. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2438-41.
- [226] Szczepanowski R, Krahn I, Puhler A, *et al.* Different molecular rearrangements in the integron of the IncP-1 beta resistance plasmid pB10 isolated from a wastewater treatment plant result in elevated beta-lactam resistance levels. *Arch Microbiol* 2004;182:429-35.
- [227] Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, *et al.* Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1179-84.
- [228] Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, *et al.* Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J Med Microbiol* 2010;59:1331-9.
- [229] Enne VI, Livermore DM, Stephens P, *et al.* Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 2001;357:1325-8.
- [230] van der Veen EL, Schilder AG, Timmers TK, *et al.* Effect of long-term trimethoprim/sulfamethoxazole treatment on resistance and integron prevalence in the intestinal flora: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in children. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:1011-6.
- [231] Levy SB. Multidrug resistance--a sign of the times. *N Engl J Med* 1998;338:1376-8.
- [232] Hoyle DV, Davison HC, Knight HI, *et al.* Molecular characterisation of bovine faecal *Escherichia coli* shows persistence of defined ampicillin resistant strains and the presence of class 1 integrons on an organic beef farm. *Vet Microbiol* 2006;115:250-7.
- [233] Walk ST, Mladonicky JM, Middleton JA, *et al.* Influence of antibiotic selection on genetic composition of *Escherichia coli* populations from conventional and organic dairy farms. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5982-9.
- [234] Smith JL, Drum DJ, Dai Y, *et al.* Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1404-14.
- [235] Barlow RS, Fegan N, Gobius KS. A comparison of antibiotic resistance integrons in cattle from separate beef meat production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* 2008;104:651-8.
- [236] Barlow RS, Fegan N, Gobius KS. Integron-containing bacteria in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* 2009;107:540-5.
- [237] Wu RB, Alexander TW, Li JQ, *et al.* Prevalence and diversity of class 1 integrons and resistance genes in antimicrobial-resistant *Escherichia coli* originating from beef cattle administered subtherapeutic antimicrobials. *J Appl Microbiol* 2011;111:511-23.

- [238] Gaze WH, Abdousslam N, Hawkey PM, *et al.* Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1802-7.
- [239] Gillings MR, Xuejun D, Hardwick SA, *et al.* Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *ISME J* 2009;3:209-15.
- [240] Gaze WH, Zhang L, Abdousslam NA, *et al.* Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J* 2011;5:1253-61.
- [241] Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* 2011;14:236-43.
- [242] Heuer H, Smalla K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ Microbiol* 2007;9:657-66.
- [243] Binh CT, Heuer H, Kaupenjohann M, *et al.* Diverse *aadA* gene cassettes on class 1 integrons introduced into soil via spread manure. *Res Microbiol* 2009;160:427-33.
- [244] Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, *et al.* Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:696-702.
- [245] Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Zhang L, *et al.* Integron prevalence and diversity in manured soil. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:684-7.
- [246] Schluter A, Szczepanowski R, Puhler A, *et al.* Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:449-77.
- [247] Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, *et al.* Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;60:166-76.
- [248] Moura A, Henriques I, Ribeiro R, *et al.* Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1243-50.
- [249] Mokracka J, Koczura R, Jablonska L, *et al.* Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011;99:817-24.
- [250] Zhang XX, Zhang T, Zhang M, *et al.* Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;82:1169-77.
- [251] Pellegrini C, Celenza G, Segatore B, *et al.* Occurrence of class 1 and 2 integrons in resistant Enterobacteriaceae collected from a urban wastewater treatment plant: first report from central Italy. *Microb Drug Resist* 2011;17:229-34.
- [252] Ma L, Zhang XX, Cheng S, *et al.* Occurrence, abundance and elimination of class 1 integrons in one municipal sewage treatment plant. *Ecotoxicology* 2011;20:968-73.
- [253] Figueira V, Serra E, Manaia CM. Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Sci Total Environ* 2011;409:1017-23.
- [254] Ramsden SJ, Ghosh S, Bohl LJ, *et al.* Phenotypic and genotypic analysis of bacteria isolated from three municipal wastewater treatment plants on tetracycline-amended and ciprofloxacin-amended growth media. *J Appl Microbiol* 2010;109:1609-18.

- [255] Ghosh S, Ramsden SJ, LaPara TM. The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;84:791-6.
- [256] Diehl DL, LaPara TM. Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. *Environ Sci Technol* 2010;44:9128-33.
- [257] Li D, Yang M, Hu J, *et al.* Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environ Microbiol* 2009;11:1506-17.
- [258] Li D, Yu T, Zhang Y, *et al.* Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Appl Environ Microbiol* 2010;3444-51.
- [259] Vinue L, Jove T, Torres C, *et al.* Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:526-9.
- [260] Cagle CA, Shearer JE, Summers AO. Regulation of the Integrase and Cassette Promoters of the Class 1 Integron by Nucleoid-Associated Proteins. *Microbiology* 2011;157:2841-53.
- [261] Dillon B, Thomas L, Mohmand G, *et al.* Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates. *J Microbiol Methods* 2005;62:221-32.
- [262] Mina NV, Burdz T, Wiebe D, *et al.* Canada's First Case of a Multi-drug Resistant *Corynebacterium diphtheriae*, isolated from a skin abscess. *J Clin Microbiol* 2011;49:40003-5.
- [263] Biskri L, Bouvier M, Guerout AM, *et al.* Comparative study of class 1 integron and *Vibrio cholerae* superintegron integrase activities. *J Bacteriol* 2005;187:1740-50.
- [264] Collis CM, Hall RM. Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features. *Microbiology* 2004;150:1591-601.
- [265] Romero A, Garcia P. Initiation of translation at AUC, AUA and AUU codons in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1991;68:325-30.
- [266] Sussman JK, Simons EL, Simons RW. *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. *Mol Microbiol* 1996;21:347-60.
- [267] Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36 Suppl 3:S8-14.
- [268] Severino P, Magalhaes VD. Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:156-62.
- [269] Leverstein-van Hall MA, Box AT, Blok HE, *et al.* Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant Enterobacteriaceae in a clinical setting. *J Infect Dis* 2002;186:49-56.
- [270] Maragakis LL. Recognition and prevention of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2010;38:S345-51.
- [271] Nseir S, Grailles G, Soury-Lavergne A, *et al.* Accuracy of American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America criteria in predicting infection or colonization with multidrug-resistant bacteria at intensive-care unit admission. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:902-8.

## *Annexe*