

Faculté de Médecine

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 octobre 2018

Par Claire DA SILVA

Née le 3 novembre 1987 à Paris XIIIème

Recherche de mouvements de cassettes d'intégrons *in vivo*

Etude chez le patient intubé ventilé et chez le patient atteint de mucoviscidose

Thèse dirigée par M. le Docteur Olivier BARRAUD

Examineurs :

M. le Professeur Kim LY, CHU de Limoges.....Président
Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY, CHU de Limoges.....Juge
M. le Professeur Philippe VIGNON, CHU de Limoges.....Juge
M. le Professeur Vincent GUIGONIS, CHU de Limoges.....Juge
M. le Docteur Thomas DAIX, CHU de Limoges.....Juge
Mme le Docteur Marie-Agnès PICAT, CHU de Limoges.....Membre invité
M. le Docteur Olivier BARRAUD, CHU de Limoges.....Directeur



Faculté de Médecine

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 octobre 2018

Par Claire DA SILVA

Né(e) le 3 novembre 1987 à Paris XIIIème

Recherche de mouvements de cassettes d'intégrons *in vivo*

Etude chez le patient intubé ventilé et chez le patient atteint de mucoviscidose

Thèse dirigée par M. le Docteur Olivier BARRAUD

Examineurs :

M. le Professeur Kim LY, CHU de Limoges.....Président
Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY, CHU de Limoges.....Juge
M. le Professeur Philippe VIGNON, CHU de Limoges.....Juge
M. le Professeur Vincent GUIGONIS, CHU de Limoges.....Juge
M. le Docteur Thomas DAIX, CHU de Limoges.....Juge
Mme le Docteur Marie-Agnès PICAT, CHU de Limoges.....Membre invité
M. le Docteur Olivier BARRAUD, CHU de Limoges.....Directeur



Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 1^{er} septembre 2017

| | |
|-------------------------------|---|
| ABOYANS Victor | CARDIOLOGIE |
| ACHARD Jean-Michel | PHYSIOLOGIE |
| ALAIN Sophie | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |
| ARCHAMBEAUD Françoise | MEDECINE INTERNE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020) |
| AUBARD Yves | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| AUBRY Karine | O.R.L. |
| BEDANE Christophe | DERMATO-VENEREOLOGIE |
| BERTIN Philippe | THERAPEUTIQUE |
| BESSEDE Jean-Pierre | O.R.L. (Surnombre jusqu'au 31-08-2018) |
| BORDESSOULE Dominique | HEMATOLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018) |
| CAIRE François | NEUROCHIRURGIE |
| CHARISSOUX Jean-Louis | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE |
| CLAVERE Pierre | RADIOTHERAPIE |
| CLEMENT Jean-Pierre | PSYCHIATRIE d'ADULTES |
| COGNE Michel | IMMUNOLOGIE |
| CORNU Elisabeth | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE |
| COURATIER Philippe | NEUROLOGIE |
| DANTOINE Thierry | GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT |
| DARDE Marie-Laure | PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE |
| DAVIET Jean-Christophe | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| DESCAZEAUD Aurélien | UROLOGIE |

| | |
|------------------------------------|--|
| DES GUETZ Gaëtan | CANCEROLOGIE |
| DESSPORT Jean-Claude | NUTRITION |
| DRUET-CABANAC Michel | MEDECINE et SANTE au TRAVAIL |
| DUMAS Jean-Philippe | UROLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2018) |
| DURAND-FONTANIER Sylvaine | ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE) |
| ESSIG Marie | NEPHROLOGIE |
| FAUCHAIS Anne-Laure | MEDECINE INTERNE |
| FAUCHER Jean-François | MALADIES INFECTIEUSES |
| FAVREAU Frédéric | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| FEUILLARD Jean | HEMATOLOGIE |
| FOURCADE Laurent | CHIRURGIE INFANTILE |
| GAUTHIER Tristan | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| GUIGONIS Vincent | PEDIATRIE |
| JACCARD Arnaud | HEMATOLOGIE |
| JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile | IMMUNOLOGIE |
| LABROUSSE François | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| LACROIX Philippe | MEDECINE VASCULAIRE |
| LAROCHE Marie-Laure | PHARMACOLOGIE CLINIQUE |
| LIENHARDT-ROUSSIE Anne | PEDIATRIE |
| LOUSTAUD-RATTI Véronique | HEPATOLOGIE |
| LY Kim | MEDECINE INTERNE |
| MABIT Christian | ANATOMIE |
| MAGY Laurent | NEUROLOGIE |
| MARIN Benoît | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| MARQUET Pierre | PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE |

| | |
|--------------------------------------|---|
| MATHONNET Muriel | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| MELLONI Boris | PNEUMOLOGIE |
| MOHTY Dania | CARDIOLOGIE |
| MONTEIL Jacques | BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE |
| MOREAU Jean-Jacques | NEUROCHIRURGIE |
| MOUNAYER Charbel | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| NATHAN-DENIZOT Nathalie | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| NUBUKPO Philippe | ADDICTOLOGIE |
| PARAF François | MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE |
| PLOY Marie-Cécile | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |
| PREUX Pierre-Marie | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| ROBERT Pierre-Yves | OPHTALMOLOGIE |
| SALLE Jean-Yves | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| SAUTEREAU Denis | GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE |
| STURTZ Franck | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre | ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES |
| TREVES Richard | RHUMATOLOGIE |
| TUBIANA-MATHIEU Nicole | CANCEROLOGIE |
| VALLEIX Denis | ANATOMIE |
| VERGNENEGRE Alain | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| VERGNE-SALLE Pascale | THERAPEUTIQUE |
| VIGNON Philippe | REANIMATION |
| VINCENT François | PHYSIOLOGIE |
| WEINBRECK Pierre | MALADIES INFECTIEUSES |
| YARDIN Catherine | CYTOLOGIE et HISTOLOGIE |

**PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES
MEDICALES**

BRIE Joël

CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

BARRAUD Olivier

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

BOURTHOUMIEU Sylvie

CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

BOUTEILLE Bernard

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

CHABLE Hélène

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
(Retraite au 31-07-2018)

DURAND Karine

BIOLOGIE CELLULAIRE

ESCLAIRE Françoise

BIOLOGIE CELLULAIRE

HANTZ Sébastien

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

JACQUES Jérémie

GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE

JESUS Pierre

NUTRITION

LE GUYADER Alexandre

CHIRURGIE THORACIQUE et
CARDIOVASCULAIRE

LIA Anne-Sophie

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

MURAT Jean-Benjamin

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

QUELVEN-BERTIN Isabelle

BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE

RIZZO David

HEMATOLOGIE

TCHALLA Achille

GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT

TERRO Faraj

BIOLOGIE CELLULAIRE

WOILLARD Jean-Baptiste

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

| | |
|---------------------------|---|
| BUCHON Daniel | (Maintenu en fonction jusqu'au 31.08.2019) |
| DUMOITIER Nathalie | (Responsable du département de Médecine Générale) |

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

| | |
|-------------------------|--|
| MENARD Dominique | (du 1 ^{er} septembre 2016 au 12 janvier 2018) |
| PREVOST Martine | (du 1 ^{er} septembre 2015 au 31 août 2018) |

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

| | |
|--------------------------------------|---|
| HOUDARD Gaëtan | (du 1 ^{er} septembre 2016 au 31 août 2019) |
| LAUCHET Nadège | (du 1 ^{er} septembre 2017 au 31 août 2020) |
| PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule | (du 1 ^{er} septembre 2015 au 31 août 2018) |

PROFESSEURS EMERITES

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| ADENIS Jean-Paul | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| ALDIGIER Jean-Claude | du 01.09.2016 au 31.08.2018 |
| BONNAUD François | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| DE LUMLEY WOODYEAR Lionel | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| DENIS François | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| GAINANT Alain | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| MERLE Louis | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| MOULIES Dominique | du 01.09.2015 au 31.08.2018 |
| VALLAT Jean-Michel | du 01.09.2014 au 31.08.2018 |
| VIROT Patrice | du 01.09.2016 au 31.08.2018 |

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} novembre 2017

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

| | |
|----------------------------|---|
| BASTIEN Frédéric | BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE |
| BAUDRIER Fabien | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| CHARISSOUX Aurélie | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| CHARPENTIER Mathieu | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| DUCHESNE Mathilde | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| FAYE Pierre-Antoine | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| GAUTHIER François | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| KONG Mélody | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| LARRADET Matthieu | BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE (Démission à compter du 1 ^{er} janvier 2018) |
| LEGRAS Claire | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION (Surnombre du 1 ^{er} novembre 2017 au 20 février 2018 inclus) |
| MARQUET Valentine | HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE |

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

| | |
|-------------------------------|---|
| AZAÏS Julie | MEDECINE INTERNE A |
| BAUDONNET Romain | OPHTALMOLOGIE |
| BIDAUT-GARNIER Mélanie | OPHTALMOLOGIE (A compter du 11 mai 2016) |
| BLOSSIER Jean-David | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE |
| BOSETTI Anaïs | GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT |
| BOUKEFFA Nejma | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| BOUSQUET Pauline | PEDIATRIE (A compter du 09 janvier 2017) |

| | |
|------------------------------------|--|
| CHAMPIGNY Marie-Alexandrine | PEDIATRIE |
| CHRISTOU Niki | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| COLOMBIÉ Stéphanie | MEDECINE INTERNE A (A compter du 02 mai 2017) |
| COMPAGNAT Maxence | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| CROSSE Julien | PEDIATRIE |
| DANTHU Clément | NEPHROLOGIE |
| DARNIS Natacha | PEDOPSYCHIATRIE |
| DELUCHE Elise | CANCEROLOGIE |
| DE POUILLY-LACHATRE Anaïs | RHUMATOLOGIE (A compter du 02 mai 2017) |
| DIDOT Valérian | CARDIOLOGIE |
| DUSSAULT-JARLAN Lucile | CARDIOLOGIE |
| EVARD Bruno | REANIMATION |
| FAURE Bertrand | PSYCHIATRIE d'ADULTES |
| FAYEMENDY Charlotte | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| GARDIC Solène | UROLOGIE |
| GORDIENCO Alen | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE |
| GOUDELIN Marine | REANIMATION |
| HARDY Jérémy | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| KRETZSCHMAR Tristan | PSYCHIATRE d'ADULTES |
| LACHATRE Denis | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| LACOSTE Marie | MALADIES INFECTIEUSES |
| GSCHWIND Marion | MEDECINE INTERNE B |
| LAFON Thomas | MEDECINE d'URGENCE |
| LAHMADI Sanae | NEUROLOGIE |

| | |
|------------------------------|--|
| LATHIERE Thomas | OPHTALMOLOGIE |
| LEHMAN Lauriane | GASTROENTEROLOGIE |
| LEPETIT Hugo | GASTROENTEROLOGIE |
| MARGUERITTE François | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| MARTINS Elie | CARDIOLOGIE |
| PRUD'HOMME Romain | DERMATOLOGIE-VENERELOGIE |
| RAMIN Lionel | ORL |
| ROUCHAUD Aymeric | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE (NRI) |
| ROUSSELLET Olivier | NEUROLOGIE |
| SAINT PAUL Aude | PNEUMOLOGIE (Démission à compter du 23 décembre 2017) |
| SALLE Henri | NEUROCHIRURGIE |
| SANGLIER Florian | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| TAÏBI Abdelkader | ANATOMIE |
| USSEGLIO-GROSSO Julie | CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE et STOMATOLOGIE |
| VAYSSE VIC Mathieu | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| VITAL Pauline | MEDECINE INTERNE B |
| VITALE Gaetano | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE |

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

DOIN Corinne

RUDELLE Karen

SEVE Léa

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

BALLOUHEY Quentin
CHIRURGIE INFANTILE
(du 1er mai 2015 au 30 avril 2019)

CROS Jérôme

ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
(du 1^{er} mai 2014 au 31 octobre 2018)

LERAT Justine

O.R.L. (du 1^{er} mai 2016 au 31 octobre 2020)

MATHIEU Pierre-Alain

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et
TRAUMATOLOGIQUE
(du 1^{er} mai 2016 au 31 octobre 2020)

A Hélène, parce que ton combat force l'admiration
A Anaïs, parce que notre amitié sera toujours au-delà des mots

« Nous sommes tous des morts en sursis »
Robert Louis Stevenson

*« Y'a des gens plein les urgences
Sous la lumière des abat-jours
Qui attendent leur billet retour
D'amour, d'amour, d'amour, d'amour, d'amour »*
Francis Cabrel

*« On est trop faibles pour s'entretuer
On est trop seuls pour se détester
On est trop mal pour s'en rajouter
On n'est trop rien pour se déchirer »*
Michel Berger pour France Gall

Remerciements

- A tous les membres du jury

A Monsieur le Professeur Kim LY de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Merci de tout cœur de l'intérêt que tu as porté à ce travail en acceptant de le juger. Merci pour toute la pédagogie et la patience dont tu as fait preuve envers moi lors de mon semestre en Médecine Interne A et en particulier en Unité de Soins Continus, dont je garde un excellent souvenir. Ta bienveillance de tous les instants est précieuse à mes yeux comme à ceux de tous les internes de la maquette de Médecine Interne, nous tous à qui tu transmets sans compter ton savoir, ta sérénité et ton ouverture d'esprit. Sois assuré de mon profond respect et de ma parfaite considération.

A Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY d'avoir accepté que ce travail de thèse soit mené au sein de l'UMR Inserm 1092 que vous dirigez, et de faire partie de ce jury. Merci pour l'ambiance unique à la fois studieuse et conviviale que vous insufflez dans les unités dont vous êtes responsable, j'ai eu la chance de pouvoir l'apprécier tant côté fac à l'UMR Inserm 1092 que côté CHU au Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène. Merci pour tous vos enseignements en Bactériologie clinique et fondamentale. Soyez assurée de mon profond respect et de ma gratitude infinie.

A Monsieur le Professeur Philippe VIGNON d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également pour ce semestre très enrichissant au sein du service de Réanimation Polyvalente ; mon appréhension à l'idée de l'intégrer n'a eu d'égale que mon inconsolable nostalgie le jour où je l'ai quitté, car c'est un service où l'on prend la pleine mesure de ce que représente la vie humaine et où l'on se révèle à soi-même. Merci pour tous vos enseignements tant pratiques que théoriques. Soyez assuré de mon profond respect et de ma haute considération.

A Monsieur le Professeur Vincent GUIGONIS d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur d'être membre de ce jury. Croyez en mes plus sincères remerciements et en ma considération distinguée.

A Monsieur le Docteur Thomas DAIX d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Il serait peu dire que j'ai apprécié mon semestre en Réanimation Polyvalente à tes côtés : j'ai vécu aux box 4-5 six mois extrêmement formateurs mais surtout une expérience humaine très forte qui restera gravée dans ma mémoire. Tous les remerciements du monde ne suffiraient pas à exprimer ma reconnaissance pour ton enseignement quotidien et polymorphe, toujours empreint d'humour, d'engagement et de grandeur d'âme. Puisses-tu continuer de transmettre aux internes et aux externes les gestes et les raisonnements de la Réanimation, et par-dessus tout comme tu le dis si bien : « l'amour du patient » !

A Madame le Docteur Marie-Agnès PICAT d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Par où commencer pour te remercier ? Je te dois tant... Tout d'abord merci de m'avoir accordé le temps matériel nécessaire à la réalisation de ce travail de thèse ! Merci pour ce trimestre de FFI où j'ai eu la chance de faire mes indispensables premières armes de médecin sous ton regard attentif et bienveillant ; merci pour ce semestre cinq ans plus tard où je suis revenue à tes côtés sans hésitation avec un plaisir immense. Merci de toute la confiance que tu m'as

témoignée dans l'exercice diagnostique, thérapeutique et relationnel de la Médecine. Les mots me manquent pour exprimer toute l'admiration et l'affection que je te porte : merci pour ta connaissance polyvalente et pourtant si humble, ta disponibilité inconditionnelle, ton sourire, ton calme olympien. Tu es la force tranquille. Chanceux furent, sont et seront tes patients, mais aussi tes équipes paramédicales, tes collègues médecins seniors, tes externes, et tes internes parmi lesquels j'ai eu le privilège de figurer.

A Monsieur le Docteur Olivier BARRAUD d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse, merci de tout cœur. Reçois l'expression de ma profonde sympathie et de mon admiration sincère. J'ai immensément apprécié ton encadrement et ce à plusieurs reprises pour des travaux différents, mais chaque fois inspirés et portés par ta curiosité scientifique, tes qualités pédagogiques, ton soutien sans faille et ton énergie inépuisable. Merci pour les bases pratiques de Bactériologie clinique à la paillasse corail lors de mon semestre au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, toujours enseignées dans l'interactivité et la bonne humeur. En tant qu'interne dans les services cliniques, merci pour ta disponibilité, ton engagement et ta réactivité sur des dossiers délicats d'infectiologie. C'est une vraie chance d'avoir travaillé avec toi, car ta vivacité d'esprit, ta ténacité, ton enthousiasme, et ta rigueur implacable poussent chacun à donner le meilleur de lui-même.

- A l'UMR 1092

A Margaux pour son aide technique irremplaçable ; j'ai souvent abusé de ta disponibilité en te demandant, angoissée, des « petits coups de pouce de dernière minute » ; merci de ne jamais m'avoir renvoyée sur les roses !

A Fabien et Sandra pour leur soutien et leur aide, notamment en ce qui concerne les souches mucoviscidose.

A Thomas pour son expertise pointue sur les intégrons et leurs réseaux de cassettes, merci également pour ton humour et ton franc-parler si rafraîchissants !

A Valentin, Victor et Emilie du Biscem pour leur aide cruciale lors de l'étape de séquençage, merci de votre disponibilité et de votre gentillesse à tous les trois.

A Gaëtan, merci mille fois pour ton amitié si précieuse, pour être resté tard au labo si souvent afin que je puisse terminer mes manips, merci pour nos virées à travers la France ; j'espère vivre encore de nombreuses péripéties en ta compagnie !

A Claire, merci de ton affection authentique ; garde cette soif d'absolu et ce refus de la mesquinerie qui te caractérisent. Je te souhaite le meilleur pour ton avenir car tu le mérites, et surtout j'espère rester longtemps au nombre de tes amis !

Merci à Chloé, Déby, Yohann, Linda, Elodie, Mélissa, Elena, Cécile, Camille, Raphaëlle, Michaël, Mathilde, Lucie, Nicolas, Martine et tous les autres pour chacun des bons moments passés ensemble (et il y en a eu beaucoup !). Ce fut un très grand plaisir de partager ces années de Master 2 puis de thèse avec vous.

- Aux techniciens et techniciennes du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, pour leur accueil chaleureux, leurs conseils et leur sympathie lors de mon semestre à leurs côtés, et pour leur aide dans ce travail de thèse. C'est toujours un bonheur de vous rendre visite !

- A tous mes co-internes de médecine interne : Marie (sa franchise légendaire, son humour irrévérencieux mais... tellement vrai), Blandine (ou « avec elle j'ai trouvé plus frontale que moi »), Xavier, Maher, Simon, Josselin, Magali, Doudou (ou « avec moi il a trouvé plus frontale que lui »), Nina, Natella, Bastien, Rémi, Florence, Romain, Marie Mathilde. Merci pour votre pétillance et votre joie de vivre, notamment lors des cours de DES mais aussi pour celles et ceux qui m'ont supportée tout un semestre !

- A toutes les personnes ayant fait de moi le médecin que je suis, en particulier :

A Madame le Professeur Françoise ARCHAMBEAUD pour votre bienveillance, vos encouragements et la confiance que vous m'avez témoignée au sein du service de Médecine Interne B, Endocrinologie et Maladies Métaboliques.

A Monsieur le Docteur Bruno FRANCOIS du service de Réanimation Polyvalente, pour l'intransigeance et la force morale infaillible que vous nous inspirez, merci de nous rappeler qu'il faut sans cesse replacer la clinique et l'esprit critique au cœur de notre métier.

A Madame le Docteur Adeline DEPLAS, d'avoir partagé sans réserve votre savoir en Rhumatologie et pour cette devise « ordre et méthode » que je me récite mentalement chaque fois que je me sens débordée...

A Madame le Docteur Christine BONNET du service de Rhumatologie, pour vos qualités pédagogiques envers externes et internes, votre empathie renouvelée auprès des patients et la confiance que vous m'avez témoignée.

A Madame le Docteur Cristina HOTEA, pour ta bonne humeur, ton courage exemplaire et pour l'indépendance que tu m'accordes tout en étant toujours accessible ; merci de partager avec enthousiasme tes connaissances en Pneumologie et Allergologie.

A Madame le Docteur Alexandra PAULAY et à Monsieur le Docteur Nicolas CHAPRON, je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir accordé de votre temps pour me présenter et me faire aimer la Médecine Thermale, cela sera un honneur d'être votre collègue à Jonzac !

- A mes amis

A Anaïs, toi qui me connais comme personne et depuis si longtemps... Merci de ton affection, ta constance et ta fidélité qui ont traversé les décennies et parcouru les distances sans s'épuiser. Je mesure la chance que j'ai de t'avoir comme meilleure amie ; je sais que rien ne nous séparera et que le meilleur est à venir !

A mes amis de lycée et tous ceux que j'ai connus par eux : Guigui, Angèle, Benoît, Cécile, Amandine, Hélène, Maïté, Audrey, Camille, Julien, Ludo, Sophie, Kiss Cool, Elodie, je vous aime tant que je vous prendrais tous en même temps dans mes bras si je le pouvais ! Merci d'être toujours là après quinze années passées ensemble, pour avoir partagé les doutes et les questions existentielles, mais surtout les rires, les danses et les petits bonheurs ; c'est grâce à vous que la vie est une fête !

A mes amis de médecine et tous ceux que j'ai connus par eux : Florian, Thomas, Elise, Jérémy, Marion C, Blondin, Julie, Amélie, Marie, Sébastien, Vincent, Michaël, vous êtes tous de belles personnes que j'ai le privilège de côtoyer, pourvu que ça dure ! Tous dans les différentes voies que vous avez choisies, je vous souhaite réussite et accomplissement. Merci pour votre soutien et votre compassion dans les moments difficiles mais surtout pour votre insouciance et votre enthousiasme contagieux lorsqu'il s'agit de profiter de la vie. Avec vous je m'embarquerais n'importe où (ou presque...) !

A tous les co-internes avec lesquels j'ai sympathisé et qui ont rendu mon internat inoubliable : Cyrielle, Benjamin P, Benjamin F, Marion S, Marine G, Bruno, Marine P, Mathilde, Pedro, et tous les autres.

- A ma famille

A Pépé et Mémé, à jamais dans mon cœur. Votre tendresse infinie, votre sagesse et votre pragmatisme guident chacun de mes actes.

A mes parents, un grand merci pour votre amour inconditionnel et votre soutien indéfectible, tant au plan logistique et matériel (ce qui est déjà beaucoup) qu'au plan moral. Merci pour cette connivence affective et intellectuelle qui n'appartient qu'à nous, je vous dois sans nul doute ma réussite, et ce à plus d'un titre. Je suis extrêmement fière d'être votre fille.

Papa, merci de m'avoir montré que ce sont les valeurs de probité et d'intégrité qui scellent notre humanité.

Maman, merci de m'avoir appris que toute forme de loyauté est nulle et non avenue si l'on n'est pas d'abord loyal à soi-même.

A ma tante Milla pour son énergie militante et son rire communicatif qui triomphe de tous les chagrins. A mes cousins et cousines Jeanne, Zoë, Ysé, Pierre, Océane, Thibaut.

- A mes externes

Ce dernier paragraphe est pour tous les externes en Médecine et en Pharmacie que j'ai eus en charge durant mon internat. Merci pour vos nombreuses questions (jamais idiotes !), pour votre œil candide et votre soif d'apprendre. J'ai beaucoup aimé partager avec vous le peu que je savais et j'espère avoir encore renforcé votre détermination à devenir Docteur dans votre discipline. Aimez vos patients, soyez exigeants envers vous-mêmes et suivez votre propre voie, mais regardez toujours l'avenir avec confiance car, comme je vous l'ai dit souvent : « on fait le plus beau métier du monde ! ».

Table des matières

| | |
|--|----|
| Préambule..... | 24 |
| I.Introduction..... | 25 |
| I.1. L'appareil respiratoire : constitution physiologique et exemples de situations pathologiques..... | 25 |
| I.1.1. Rappels anatomiques..... | 25 |
| I.1.2. Rappels histologiques..... | 26 |
| I.1.3. Le microbiote pulmonaire..... | 28 |
| I.1.4. Exemples de situations pathologiques..... | 29 |
| I.1.4.1. La mucoviscidose..... | 29 |
| I.1.4.2. Le patient intubé sous ventilation mécanique..... | 30 |
| I.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 31 |
| I.2.1. Caractéristiques microbiologiques..... | 31 |
| I.2.2. Habitat et pouvoir pathogène..... | 33 |
| I.2.3. Facteurs de virulence..... | 34 |
| I.2.4. Résistances aux antibiotiques..... | 35 |
| I.2.4.1. Résistances naturelles..... | 35 |
| I.2.4.2. Résistances acquises..... | 36 |
| I.3. Les intégrons de résistance..... | 37 |
| I.3.1. Structure..... | 38 |
| I.3.1.1. La région 5'CS..... | 38 |
| I.3.1.2. La région variable..... | 39 |
| I.3.2. Mécanistique..... | 39 |
| I.3.2.1. L'activité de l'intégrase..... | 39 |
| I.3.2.2. Les réarrangements de cassettes..... | 40 |
| I.4. Objectifs..... | 41 |
| II. Matériel et méthodes..... | 42 |
| II.1. Provenance des souches bactériennes analysées..... | 42 |
| II.2. Etude du phénotype de résistance..... | 43 |
| II.3. Extraction de l'ADN total des souches bactériennes..... | 44 |
| II.4. Séquençage haut débit..... | 44 |
| II.4.1. Préparation des librairies..... | 44 |
| II.4.2. Amplification clonale par PCR émulsion (Plateforme Biscem)..... | 45 |
| II.4.3. Réaction de séquençage par technologie Ion Proton™ (Plateforme Biscem)..... | 45 |
| II.5. Post-traitement des données et analyse bioinformatique..... | 46 |
| II.5.1. Assemblage des reads (Plateforme Biscem)..... | 47 |
| II.5.2. Analyse bioinformatique..... | 47 |
| II.5.2.1. Caractérisation des réseaux de cassettes d'intégrons..... | 47 |
| II.5.2.2. Etude des variants de <i>Pc</i> | 48 |
| II.5.2.3. Analyse de la clonalité des souches..... | 49 |
| II.5.2.4. Recherche de gènes de résistance acquis hors intégrons..... | 50 |
| III. Résultats..... | 51 |
| III.1. Phénotypes de résistance des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 51 |
| III.2. Analyse qualitative et quantitative des données générées par le NGS..... | 52 |
| III.2.1. Analyse qualitative..... | 52 |
| III.2.2. Analyse quantitative..... | 52 |

| | |
|--|----|
| III.3. Caractérisation des réseaux de cassettes d'intégrons..... | 53 |
| III.3.1. Souches isolées des patients de Réanimation..... | 53 |
| III.3.1.1. Patient A..... | 53 |
| III.3.1.2. Patient B..... | 53 |
| III.3.1.3. Patient C..... | 54 |
| III.3.1.4. Patient D..... | 54 |
| III.3.1.5. Patient E..... | 55 |
| III.3.1.6. Patient F..... | 56 |
| III.3.2. Souches isolées de patients atteints de mucoviscidose..... | 56 |
| III.3.2.1. Patient PH..... | 56 |
| III.3.2.2. Patient MM..... | 57 |
| III.3.2.3. Patient LL..... | 58 |
| III.3.2.4. Patient MMy..... | 58 |
| III.4. Recherche des différents variants du promoteur Pc..... | 59 |
| III.4.1. Souches issues de patient de Réanimation..... | 59 |
| III.4.2. Souches issues de patients atteints de mucoviscidose..... | 60 |
| III.5. Etude de la clonalité des souches..... | 61 |
| III.5.1. Sérotypage..... | 61 |
| III.5.2. Multilocus Sequence Typing..... | 62 |
| III.5.3. Construction des arbres phylogénétiques..... | 64 |
| III.6. Les gènes de résistance acquis hors réseaux de cassettes d'intégrons..... | 66 |
| III.6.1. Souches issues de patients de Réanimation..... | 66 |
| III.6.2. Souches issues de patients atteints de mucoviscidose..... | 67 |
| IV. Discussion..... | 69 |
| Conclusion..... | 75 |
| Références bibliographiques | 76 |
| Annexes..... | 86 |

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

dNTP : désoxynucléotide tri-phosphate

gcu : *gene cassette of unknown signification* (cassette de fonction inconnue)

IS : *Insertion sequence* (séquence d'insertion)

ISP : *Ion Sphere Particle*

MLST : *Multilocus sequence typing*

ORF : *Open Reading Frame* (cadre ouvert de lecture)

pb : paire de bases (kb = 1000 pb, Mb = 1000000 pb)

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

ppi : pour préparation injectable

3'CS : 3' conserved segment

5'CS : 5' conserved segment

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1 : schéma des voies respiratoires..... | 25 |
| Figure 2 : illustration du fonctionnement d'une alvéole pulmonaire..... | 26 |
| Figure 3 : coupe histologique d'un épithélium bronchique normal..... | 27 |
| Figure 4 : répartition des différents groupes bactériens au sein du microbiote pulmonaire normal..... | 29 |
| Figure 5 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en coloration de Gram..... | 32 |
| Figure 6 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en culture sur milieu de Müller-Hinton..... | 32 |
| Figure 7 : schéma simplifié du système de sécrétion de type 3..... | 35 |
| Figure 8 : structure d'un intégron..... | 38 |
| Figure 9 : réponse SOS bactérienne entraînant l'expression de l'intégrase..... | 40 |
| Figure 10 : insertion et excision de cassettes au sein d'un intégron..... | 40 |
| Figure 11 : réarrangement observé <i>in vivo</i> au sein d'un réseau de cassettes d'intégron de classe 1.. | 41 |
| Figure 12 : antibiogramme d'une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques)..... | 43 |
| Figure 13 : ADN fragmenté lié aux séquences adaptatrices A et P1..... | 44 |
| Figure 14 : une « <i>ion sphere particle</i> » (ISP) monoclonale avec amorces biotinylées..... | 45 |
| Figure 15 : schéma de fonctionnement du séquençage par la technologie Ion Proton™..... | 46 |
| Figure 16 : assemblage des <i>reads</i> en <i>contigs</i> | 47 |
| Figure 17 : capture d'écran lors de l'utilisation de la fonction « <i>map to reference</i> » du logiciel Geneious® (Biomatters)..... | 48 |
| Figure 18 : capture d'écran lors d'alignements des séquences Pc dans le logiciel Geneious® (Biomatters)..... | 49 |
| Figure 19 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches R1 et R2 (Patient A)..... | 53 |
| Figure 20 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches R3 et R4 (Patient B)..... | 54 |
| Figure 21 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches R5, R6 et R7 (Patient C)..... | 54 |
| Figure 22 : réseaux de cassettes portés par les intégrons de souches R8, R9 et R12 (Patient D)..... | 55 |
| Figure 23 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches R10, R11 et R13 (Patient E)..... | 55 |
| Figure 24 : réseaux de cassettes portés par les intégrons des souches R14, R15 et R16 (Patient F)..... | 56 |
| Figure 25 : réseaux de cassettes portés par les intégrons des souches PH et PH41 (Patient PH)..... | 57 |
| Figure 26 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches MM23, MM32, MM41 et MM49 (Patient MM)..... | 58 |
| Figure 27 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches LL20, LL22 et LL26 (Patient LL)..... | 58 |
| Figure 28 : réseaux de cassettes portés par les intégrons des souches MMy5, MMy9 et MMy11 (Patient MMy)..... | 59 |
| Figure 29 : arbre phylogénétique des souches issues des patients de Réanimation..... | 65 |
| Figure 30 : arbre phylogénétique des souches issues des patients atteints de mucoviscidose..... | 66 |

Table des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Principaux antibiotiques testés en routine sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , classés par familles..... | 36 |
| Tableau 2 : Les principaux variants du promoteur Pc au sein des intégrons de classe 1..... | 39 |
| Tableau 3 : Souches, patients correspondant et dates de prélèvements..... | 42 |
| Tableau 4 : Phénotypes de résistance des 28 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 51 |
| Tableau 5 : Score de profondeur moyenne de séquençage pour chaque souche sur le génome de référence PAO1..... | 52 |
| Tableau 6 : Nombre de contigs générés pour chaque souche..... | 52 |
| Tableau 7 : variants de Pc pour chaque intégron de chacune des souches issues des patients de Réanimation..... | 60 |
| Tableau 8 : Variants de Pc pour chaque intégron de chacune des souches issues des patients atteints de mucoviscidose..... | 61 |
| Tableau 9 : Sérotype correspondant à chaque souche issue des patients de Réanimation..... | 62 |
| Tableau 10 : Sérotype correspondant à chaque souche issue des patients atteints de mucoviscidose.. | 62 |
| Tableau 11 : Résultats du <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) pour les souches issues des patients de Réanimation..... | 63 |
| Tableau 12 : Résultats du <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) pour les souches issues des patients atteints de mucoviscidose..... | 64 |
| Tableau 13 : Gènes de résistance acquis en dehors des réseaux de cassettes d'intégrons pour les souches issues de patients de Réanimation..... | 67 |
| Tableau 14 : Gènes de résistance acquis en dehors des réseaux de cassettes d'intégrons pour les souches issues de patients atteints de mucoviscidose..... | 68 |

Préambule

Depuis la fin de la première moitié du XX^{ème} siècle, le pronostic des infections bactériennes n'a cessé d'être considérablement amélioré par l'usage des antibiotiques. Malheureusement, au fil du temps, ont émergé des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, et ce dès les premières années d'utilisation de ces molécules ¹.

De nos jours, l'antibiorésistance est devenue une problématique majeure de santé publique ² ; en effet on ne découvre quasiment plus de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettraient de mettre au point de nouvelles molécules, ce qui rend extrêmement difficile le traitement d'infections à bactéries multi-résistantes. D'autre part, les résistances aux antibiotiques sont exprimées par des gènes d'une grande diversité, qui peuvent être portés par plusieurs types de structures au sein du génome bactérien. Enfin, les bactéries sont capables d'effectuer des transferts génétiques d'un individu à l'autre, y compris entre individus d'espèces différentes. De nombreux facteurs concourent donc à l'émergence, à la persistance et à la dissémination des résistances aux antibiotiques.

Afin de lutter contre l'antibiorésistance, notamment en milieu hospitalier, plusieurs approches synergiques sont envisageables, bien qu'elles ne soient pas toutes mises en pratique à l'heure actuelle : l'observation de bonnes pratiques pour la prescription et l'usage des anti-infectieux ³, le respect de règles d'hygiène évitant la dissémination des résistances bactériennes, un traitement particulier des effluents d'eaux usées provenant d'institutions sanitaires ⁴, mais aussi une meilleure compréhension des mécanismes d'acquisition et de diffusion des résistances aux antibiotiques.

Les intégrons de résistance sont des éléments génétiques bactériens capables de capturer et d'exprimer des gènes de résistance aux antibiotiques ⁵; en cela ils sont considérés comme des acteurs majeurs de la persistance et de la dissémination de l'antibiorésistance au sein des populations bactériennes. Les intégrons de résistance peuvent acquérir différents gènes sous forme de cassettes, disposées les unes à la suite des autres pour former un réseau. *A contrario* ils sont également capables de se défaire de ces cassettes en les excisant du réseau. Cette plasticité, un atout inhérent aux intégrons, a été démontrée à maintes reprises *in vitro* ^{6, 7, 8, 9} mais n'a été décrite qu'une seule fois *in vivo*, au sein du génome d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée en médecine humaine à partir de prélèvements respiratoires ¹⁰.

Le laboratoire de Bactériologie – Virologie – Hygiène du CHU de Limoges dispose de plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa* issues de prélèvements répétés au cours du temps chez un même patient, et dans lesquelles la présence d'intégrons de résistance a été détectée. Ces souches sont issues de prélèvements respiratoires provenant de patients atteints de mucoviscidose en unités de Pathologie Respiratoire et Pédiatrie, ainsi que de patients intubés sous ventilation mécanique en unité de Réanimation Polyvalente.

L'objectif primaire de ce travail était de rechercher, au sein des intégrons détectés chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, d'éventuelles variations dans la composition des réseaux de cassettes chez un même patient au cours du temps. Nous avons également étudié le caractère clonal de ces différentes souches au moyen d'une analyse génotypique. Enfin, nous nous sommes attachés à décrire les gènes de résistance acquis ne se présentant pas sous la forme de cassettes d'intégrons.

I. Introduction

I.1. L'appareil respiratoire : constitution physiologique et exemples de situations pathologiques

La respiration, processus biologique indispensable à la vie des organismes animaux, représente l'ensemble des mécanismes par lesquels les cellules assurent les échanges gazeux avec le milieu extérieur. Ce processus a pour but d'apporter aux cellules le dioxygène (O_2) dont elles ont besoin et de les décharger du dioxyde de carbone (CO_2) qu'elles produisent. Une telle fonction justifie une organisation anatomique particulière et une spécialisation tissulaire complexe.

I.1.1. Rappels anatomiques

L'appareil respiratoire est divisé en deux parties : les voies respiratoires et les poumons.

Les voies respiratoires sont l'ensemble des voies que l'air emprunte pour aboutir aux poumons (Figure 1). Elles comprennent :

- Les fosses nasales
- Le pharynx
- Le larynx
- La trachée, qui se sépare au niveau de la carène en une bronche principale gauche et une bronche principale droite.
- Les bronches : chaque bronche principale se ramifie en bronches lobaires, elles-mêmes se divisant en bronches segmentaires.

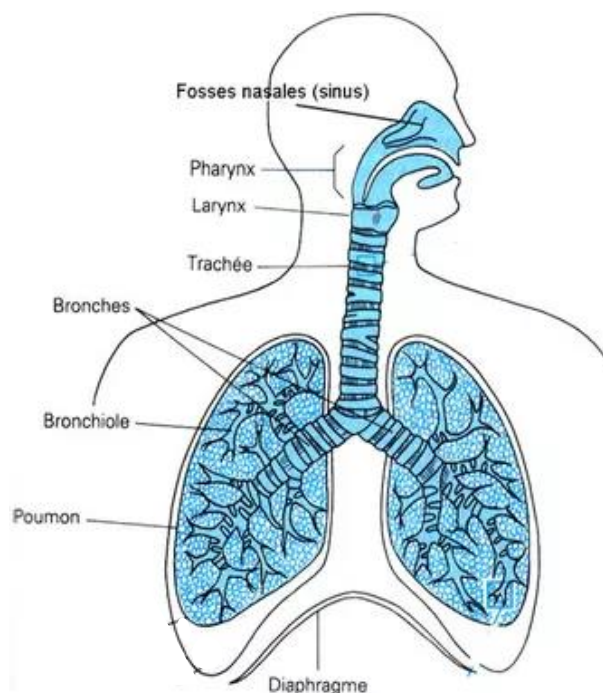


Figure 1 : schéma des voies respiratoires

En aval, à la suite d'un certain nombre de divisions dichotomiques, se situent les bronchioles respiratoires puis les bronchioles terminales. Enfin, au 23^{ème} niveau de division, apparaissent les alvéoles.

Les poumons sont formés par la juxtaposition des alvéoles dont elles sont l'élément fonctionnel et fondamental. Il existe un poumon droit constitué de trois lobes et un poumon gauche constitué de deux lobes ; ils sont situés dans la cage thoracique et reposent sur le diaphragme.

Les alvéoles sont le véritable lieu des échanges gazeux, en contact avec un important réseau de capillaires (Figure 2). Elles sont divisées en lobules, chaque lobule comportant 3 à 30 *acini* qui représentent la plus petite unité fonctionnelle du poumon.

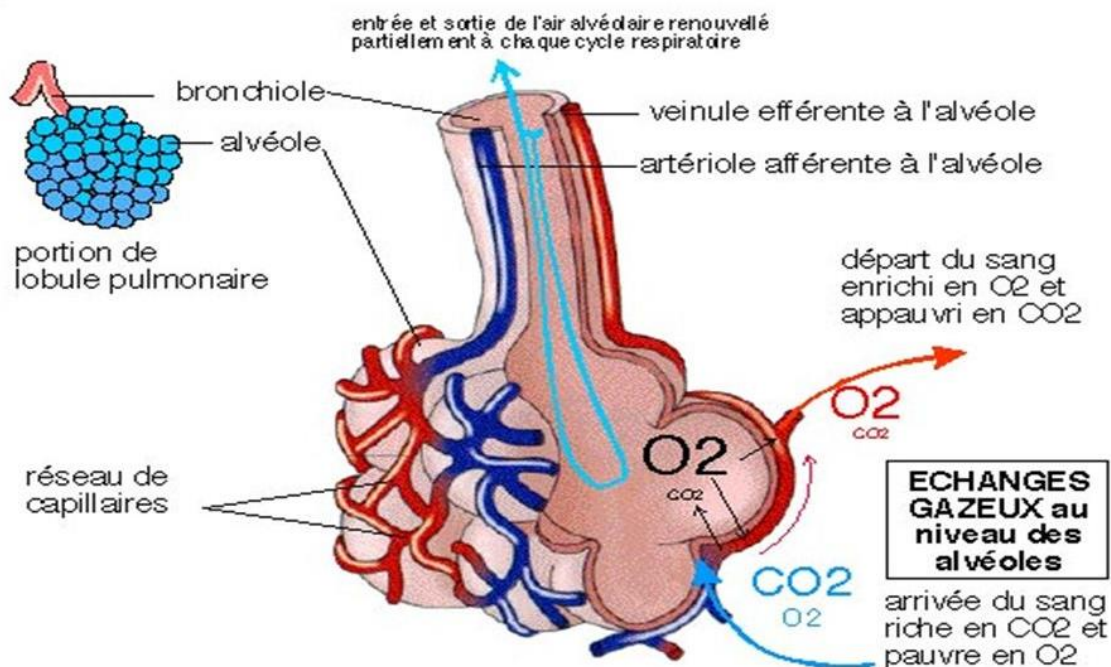


Figure 2 : illustration du fonctionnement d'une alvéole pulmonaire

I.1.2. Rappels histologiques

Les parois des voies respiratoires sont composées de plusieurs couches permettant d'apporter rigidité, flexibilité et élasticité. Ainsi sont distinguées, de l'extérieur vers la lumière :

- L'adventice, couche externe constituée d'un tissu conjonctivo-adipeux contenant des vaisseaux et des nerfs.
- La couche cartilagineuse : formant une armature de 16 à 20 anneaux au niveau de la trachée, elle s'amincit au niveau des bronches à mesure que diminue le diamètre bronchique, pour disparaître complètement au niveau des bronchioles.
- La tunique musculaire lisse, permettant les phénomènes de bronchoconstriction et de bronchodilatation
- La muqueuse, composée d'un chorion et d'un épithélium reposant sur une membrane basale.

L'épithélium respiratoire est pseudo-stratifié au niveau des bronches, devenant cylindrique puis cubique au niveau des bronchioles. Il est composé de 4 types cellulaires (Figure 3) :

- Les cellules ciliées, les plus abondantes, jouent un rôle capital dans l'épuration pulmonaire. Les cils (de 200 à 300 par cellule) se situent au pôle apical et battent à une fréquence régulière de 10 à 20 battements par seconde. Associés au mucus, ils forment ce que l'on appelle l'escalator mucociliaire dont la fonction est d'emprisonner et d'évacuer tout élément indésirable en le ramenant vers la partie supérieure des voies aériennes. Entre les cils existent quelques microvillosités.
- Les cellules caliciformes ou cellules à mucus (une pour 5 cellules ciliées environ) participent, avec les sécrétions des glandes séro-muqueuses, à la formation du mucus. Cette substance permet d'emprisonner les impuretés de l'air inspiré et d'absorber certains gaz (SO₂, ozone...) ; le mucus possède également des propriétés antibactériennes.
- Les cellules basales sont de petites cellules situées dans la partie profonde de l'épithélium, contre la membrane basale. Capables de remplacer n'importe quel autre type de cellule bronchique, elles sont donc indispensables au renouvellement cellulaire.
- Les cellules neuroendocrines, largement minoritaires, appartiennent au système neuroendocrinien diffus. Elles se groupent pour former des corps neuro-épithéliaux, chémorécepteurs capables de détecter les variations de teneur en O₂ ou CO₂ de l'air.



Figure 3 : coupe histologique d'un épithélium bronchique normal.

L'épithélium alvéolaire est quant à lui composé de 2 types cellulaires :

- Les pneumocytes de type I, qui recouvrent 97% de la paroi alvéolaire. Ce sont des cellules aplaties dont le rôle principal est d'être imperméables aux liquides mais perméables aux gaz. Avec la membrane basale et l'endothélium capillaire, ils forment la barrière alvéolo-capillaire.
- Les pneumocytes de type II sont des cellules plus volumineuses, cubo-cylindriques, qui produisent le surfactant. Cette substance, composée de protéines à propriétés tensio-actives et de phospholipides, recouvre la surface alvéolaire et évite le collapsus pulmonaire en diminuant la tension de surface afin de diminuer la force d'inspiration nécessaire pour dilater l'alvéole. Le surfactant possède également des propriétés antibactériennes. Par ailleurs, ce type cellulaire possède des capacités de présentation antigénique et sécrète des cytokines pro-inflammatoires, ce qui en fait un acteur important de la réponse immunitaire locale pulmonaire.

I.1.3. Le microbiote pulmonaire

Le microbiote est l'ensemble des microorganismes (bactéries, virus, champignons, *etc.*) vivant au sein d'un environnement particulier ¹¹. Cet environnement peut être constitué par un site géographique, mais aussi par tout ou partie d'un être vivant pluricellulaire.

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle et durant des décennies, il a été communément supposé que les voies respiratoires à l'état physiologique étaient stériles. Cependant, depuis le début des années 2010, différents travaux ont concouru à démontrer qu'il n'en était rien : à l'instar de la peau ou du système digestif, le système respiratoire est le lieu de vie d'une flore microbienne résidente riche, et ce même en l'absence de toute pathologie aiguë ou chronique ^{12, 13}. Pour ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux espèces bactériennes.

La mise en évidence de bactéries commensales au sein des voies respiratoires a été rendue possible par les avancées technologiques en microbiologie médicale : milieux permettant de cultiver un spectre de bactéries de plus en plus large y compris des espèces très fragiles et très exigeantes. Néanmoins c'est la biologie moléculaire qui a fourni l'apport technique majeur dans ce champ de recherche, rendant possible la détection directe d'ADN bactérien au sein d'un prélèvement, permettant ainsi de s'affranchir de l'étape de la culture bactérienne. Outre le gain de temps offert par une telle technologie, cette dernière a l'avantage de détecter, d'identifier et de quantifier des populations, même peu importantes, de bactéries non cultivables ¹⁴. Ceci constitue un atout considérable ; en effet on suppose qu'un centième seulement des bactéries sur Terre est capable de se développer en milieu de culture, tous milieux confondus.

A la naissance, le microbiote respiratoire du nourrisson est proche de celui de la cavité buccale, et fortement influencé par la voie de l'accouchement ¹⁵. Par la suite, il se différencie progressivement durant l'enfance pour devenir à l'adolescence quasiment comparable à celui de l'adulte.

La densité bactérienne du microbiote respiratoire d'un adulte en bonne santé est d'environ 50 000 bactéries par cm² ¹⁶. La population est constituée surtout de bactéries appartenant au groupe des *Firmicutes* et au groupe des *Bacteroidetes* ; les genres majoritaires sont *Peptostreptococcus spp*, *Veillonella spp*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp* et

Bacteroides spp^{16, 17}. L'écologie bactérienne de l'appareil respiratoire chez l'adulte sain est représentée en Figure 4.

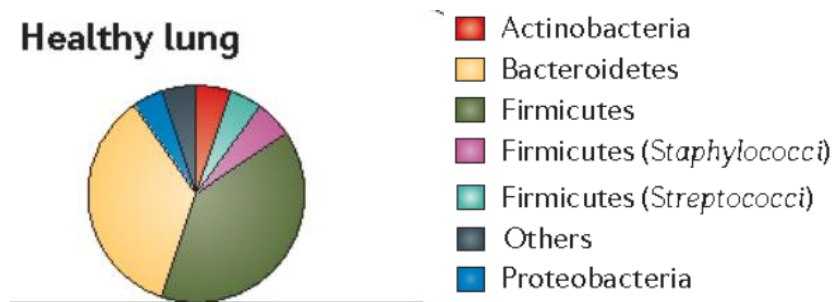


Figure 4 : répartition des différents groupes bactériens au sein du microbiote pulmonaire normal.

Il existe une multitude d'interactions entre le microbiote et les processus biochimiques, notamment immunologiques, de l'hôte. Lors d'un processus pathogène tel qu'une inflammation locale chronique, une altération du mucus, l'introduction d'un corps étranger, *etc.*, l'équilibre des espèces bactériennes au sein du microbiote est modifié^{18, 19, 20}, c'est ce que l'on appelle la dysbiose. Cette dysbiose peut mener au développement en trop grande quantité d'une bactérie commensale pouvant devenir pathogène, ou bien au développement d'un germe pathogène issu de l'environnement extérieur qui aurait involué au sein d'un microbiote équilibré.

Malgré les nombreuses avancées dans le champ de recherche des différents microbiotes humains, il reste difficile de déterminer la nature et l'ordre chronologique des relations entre pathologie clinique voire infraclinique et dysbiose²¹.

I.1.4. Exemples de situations pathologiques

I.1.4.1. La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique à transmission autosomique récessive due à une mutation du gène *cftr* codant la protéine CFTR qui est principalement un transporteur membranaire de l'ion chlorure. Plus de 1900 mutations sont répertoriées à ce jour²², la plus fréquente en France consistant en une délétion de la phénylalanine en 508^{ème} position de la chaîne peptidique. Il en résulte une protéine non fonctionnelle, altérant les fonctions de plusieurs épithéliums glandulaires exocrines du corps humain.

Il existe des manifestations digestives intestinales : constipation chronique, syndrome occlusif ; ou encore hépatiques : cirrhose biliaire primitive par hyperviscosité biliaire ; mais aussi une insuffisance pancréatique exocrine responsable d'un défaut d'absorption des lipides et vitamines liposolubles, pouvant conduire à un retard de croissance staturo-pondéral.

Chez l'homme, la mucoviscidose entraîne une stérilité par agénésie bilatérale des canaux déférents. Chez la femme, cette pathologie conduit à une hypofertilité due à des modifications de la glaire cervicale.

Enfin, les manifestations broncho-pulmonaires de la mucoviscidose en constituent la cause majeure de morbi-mortalité²³. Elles sont en lien avec une hyperviscosité du mucus bronchique, qui rend plus difficile son évacuation par l'escalator mucociliaire. Cette altération entraîne

d'une part une obstruction bronchique chronique aggravative, conduisant à une insuffisance respiratoire chronique obstructive, facilitant en elle-même les épisodes infectieux broncho-pulmonaires et provoquant à un stade avancé un retentissement cardiaque à type de cœur pulmonaire chronique avec hypertension artérielle pulmonaire ²⁴. D'autre part, l'hyperviscosité du mucus altère la capacité à éliminer mécaniquement d'éventuels germes pathogènes ; enfin, cette hyperviscosité induit des phénomènes inflammatoires chroniques ainsi qu'une dysbiose du microbiote par modification des conditions de vie des bactéries par rapport à un individu sain. La répartition des espèces bactériennes est donc perturbée au sein du système respiratoire des patients atteints de mucoviscidose : on observe une proportion plus grande par exemple d'*Haemophilus influenzae* et de *Staphylococcus aureus* au début de la maladie, puis une colonisation de plus en plus importante par *Pseudomonas aeruginosa*, des entérobactéries ou encore parfois *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia* ²⁵. Ces espèces bactériennes sont ainsi fréquemment responsables de complications septiques à point de départ bronchopulmonaire.

La prévalence de la mucoviscidose en France est de 1 sur 4500 naissances environ ²⁶, ce qui en fait la maladie génétique grave la plus fréquente au sein de l'ethnie caucasienne. En France depuis 2002, un test de dépistage systématique est réalisé au troisième jour de vie par prélèvement d'une goutte de sang sur papier buvard.

L'âge moyen de décès en France était de 31,8 ans en 2016 ²⁷. Il n'existe pas à ce jour de traitement curatif pour cette pathologie ; des traitements symptomatiques peuvent être employés (mucolytiques, kinésithérapie respiratoire, laxatifs, ...), les exacerbations infectieuses peuvent être traitées individuellement par antibiothérapie, enfin le recours à la greffe pulmonaire est de plus en plus fréquent et permet une augmentation de l'espérance de vie d'environ 8 ans ²⁸.

I.1.4.2. Le patient intubé sous ventilation mécanique

Lorsqu'un patient n'est plus en capacité d'assurer des échanges gazeux corrects *via* l'appareil respiratoire par respiration spontanée, il est en situation d'insuffisance respiratoire. L'étiologie de cette défaillance peut être liée à un état pathologique aigu ou chronique décompensé des voies respiratoires ou du parenchyme pulmonaire, mais aussi à une affection neurologique, un déséquilibre métabolique, *etc.* Une insuffisance respiratoire aiguë sévère conduit au décès du patient en l'absence de prise en charge adéquate. Celle-ci consiste en une intubation oro-trachéale afin de mettre en place une ventilation artificielle au moyen d'un respirateur, permettant de paramétrer entre autres la fraction d'O₂ administrée au patient, la fréquence respiratoire souhaitée, les volumes respiratoires, ...

Cependant, ce traitement présente des risques iatrogènes. En effet, les altérations cellulaires provoquées par les modifications des pressions au sein du poumon peuvent donner lieu à des réactions inflammatoires parenchymateuses, *a fortiori* en présence d'une pathologie pulmonaire préexistante ²⁹. Par ailleurs, l'introduction d'une sonde d'intubation dans la trachée peut induire ou aggraver une inflammation des voies aériennes ³⁰; de plus, au sein de ce corps étranger et de la trachée elle-même peut se développer une colonisation bactérienne sous forme de biofilm, souvent dès les premières 24 heures après l'intubation ³¹. On observe en

outre chez ces patients une dysbiose du microbiote buccal et gingival susceptible de gagner les voies respiratoires ³², ainsi qu'un risque majoré d'inhalation(s) ou de micro-inhalation(s) de liquide gastrique ³³. Les aspirations endotrachéales pluriquotidiennes, bien que nécessaires et assorties de mesures de précaution, peuvent également entraîner l'introduction de microorganismes exogènes au sein de l'appareil respiratoire. Enfin, en cas de contamination bactérienne du respirateur ou de ses circuits par un germe environnemental, il existe un risque de contamination des voies respiratoires.

Tous ces facteurs de risque, ajoutés aux perturbations des mécanismes immunologiques systémiques dues au stress physique majeur que représente une intubation avec ventilation mécanique ³⁴, peuvent concourir à l'apparition d'une complication infectieuse redoutée : la pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM). Le diagnostic de PAVM est posé devant un faisceau d'arguments : la dégradation brutale de l'hématose, l'apparition d'un foyer infectieux auscultatoire et/ou radiologique et l'aspect purulent des sécrétions respiratoires. La fièvre, un syndrome inflammatoire ou la détection de matériel microbiologique dans les prélèvements respiratoires ne suffisent pas à eux seuls à affirmer le diagnostic ³⁵.

Il y a quelques années encore, on distinguait les PAVM précoces et tardives, selon qu'elles survenaient avant ou après 7 jours de ventilation. Depuis peu, cette distinction tend à être abandonnée au profit d'approches préventive, diagnostique et thérapeutique davantage centrées sur le terrain du patient et ses facteurs de risque individuels ³⁶. Dans les pays occidentaux, les PAVM sont le plus souvent causées par des entérobactéries (en particulier *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*), mais aussi par *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Haemophilus influenzae*. ^{37, 38, 39}.

Le traitement repose sur une antibiothérapie bactéricide à bonne diffusion pulmonaire et une adaptation des paramètres ventilatoires, toutefois la mortalité reste élevée, de 10 à 30% dans les pays développés ⁴⁰.

I.2. *Pseudomonas aeruginosa*

I.2.1. Caractéristiques microbiologiques

Pseudomonas aeruginosa est une espèce bactérienne appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*, à la famille des *Pseudomonadaceae*. Ce bacille à Gram négatif non sporulé, fin et droit (Figure 5) est aérobic strict, non exigeant, non fermentaire, catalase positive, oxydase positive, nitrate réductase positive. A l'état frais, il possède une mobilité caractéristique par ciliature monotriche.



Figure 5 : *Pseudomonas aeruginosa* en coloration de Gram

Il peut être cultivé sur milieux ordinaires mais aussi sur gélose au cétrimide. En culture, la plupart des souches expriment deux pigments : un pigment bleu nommé pyocyanine, très spécifique de cette espèce, et un pigment vert fluorescent nommé pyoverdine. Ces pigments confèrent une couleur caractéristique, entre le bleu turquoise et le vert-de-gris (Figure 6). Il s'en dégage également une odeur très particulière, due à l'O-amino-acétophénone, proche du seringa ou de l'acacia.



Figure 6 : *Pseudomonas aeruginosa* en culture sur milieu de Müller-Hinton

On compte 20 sérotypes au sein de cette espèce, que l'on distingue d'après l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS), nommés de O1 à O20.

Pseudomonas aeruginosa possède un génome d'environ 6 millions de pb, plus grand que celui des autres bactéries à Gram négatif (1,5 fois plus grand environ que celui d'*Escherichia coli*) et dont la plasticité est supérieure.

I.2.2. Habitat et pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa est un germe ubiquitaire de l'environnement aquatique : rivières, lacs, sols, mais aussi piscines, douches, jacuzzi, eaux usées, etc^{41, 42}. Il s'organise en biofilm, ce qui optimise sa persistance et promeut son caractère pathogène⁴³. Ce n'est pas une bactérie commensale de l'organisme humain mais au contraire un pathogène opportuniste redoutable pour les patients immunodéprimés, atteints de pathologies chroniques graves (telles que la mucoviscidose par exemple), grands brûlés, intubés-ventilés, ou aux âges extrêmes de la vie.

Il est majoritairement responsable d'infections liées aux soins, notamment en milieu hospitalier où il peut entraîner de véritables épidémies⁴⁴. La contamination peut être directe par eau contaminée ou par gouttelettes inhalées ou ingérées de patient à patient, ou bien indirecte via un portage manuel par les soignants ou du matériel diagnostique ou thérapeutique non adéquatement décontaminé.

Il n'existe pas de tropisme d'organe particulier à *Pseudomonas aeruginosa* ; par conséquent les pathologies qu'il peut occasionner sont multiples.

Sont recensées ainsi par ordre croissant de gravité :

- Des infections superficielles : otites, kératites et conjonctivites, folliculites et surinfections cutanées.
- Des infections urinaires sur sonde urétérale ou vésicale (12% à 18% seraient dues à *Pseudomonas aeruginosa* en Unité de Soins Intensifs⁴⁵)
- Des bactériémies, dont 5 à 15% seraient causées en milieu hospitalier par *Pseudomonas aeruginosa*⁴⁶ et dont la mortalité serait de 30 à 50%⁴⁷.
- Des infections bronchopulmonaires :
 - Selon les séries, de 2,5% à 28% des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique seraient dues à *Pseudomonas aeruginosa* en Europe ces dix dernières années^{48, 49, 50}.
 - Pneumopathies nosocomiales sans ventilation mécanique
 - Surinfections bronchiques chez les patients atteints de mucoviscidose (70% à 80% des patients colonisés⁵¹)

Ces infections peuvent se compliquer de séquelles au long cours telles que des dilatations de bronches, qui rendent les voies respiratoires davantage susceptibles aux infections à germes opportunistes, constituant ainsi un cercle vicieux.

La mortalité totale attribuée aux infections de la sphère respiratoire à *Pseudomonas aeruginosa* serait de 55%⁵².

I.2.3. Facteurs de virulence

A la différence des autres espèces proches, *Pseudomonas aeruginosa* synthétise un grand nombre de facteurs de virulence dont les cibles et les mécanismes d'action sont variés.

Certains d'entre eux jouent un rôle dans la phase d'adhésion de la bactérie aux cellules, notamment épithéliales, plus particulièrement si celles-ci sont lésées :

- Les lectines : protéines cytoplasmiques mais également exprimés à la surface de la membrane. La lectine A se lie préférentiellement au galactose, tandis que la lectine B a une forte affinité pour le fructose. Toutes deux sont cytotoxiques et ont la capacité d'inhiber les battements ciliaires de l'épithélium bronchopulmonaire ⁵³.
- Les pili de type IV, principales adhésines de *Pseudomonas aeruginosa* qui ont une forte affinité pour les cellules épithéliales notamment respiratoires.
- Le flagelle : outre son rôle évident dans la mobilité, il est impliqué dans l'internalisation du corps bactérien via son adhésion à la couche de mucine ⁵⁴.

Certaines autres molécules participent à l'invasion et à la destruction tissulaire lors de l'infection aiguë :

- L'endotoxine du lipopolysaccharide (LPS) augmente de façon majeure la réponse inflammatoire de l'hôte via les cytokines pro-inflammatoires, ce qui peut conduire au choc septique
- L'élastase : cette métalloprotéase à zinc est capable de dégrader l'élastine, mais aussi le collagène, la fibrine, l'interféron gamma, le *Tumor Necrosis Factor* (TNF), les immunoglobulines A et G et le complément ^{55, 56}. Elle permet donc l'invasion tissulaire et l'altération de la réponse immunitaire de l'hôte.
- La pyocyanine : loin d'être un simple pigment, elle induit l'apoptose des polynucléaires neutrophiles et participe au stress oxydatif causant une nécrose tissulaire chez l'hôte ⁵⁷.
- L'exotoxine A : cette ADP-ribosyl-transférase est le composant le plus cytotoxique sécrété par *Pseudomonas aeruginosa* ; elle inhibe la synthèse protéique cellulaire, provoquant une mort par nécrose ⁵⁸.
- Le système de sécrétion de type III est une protéine transmembranaire possédant un appendice capable de transpercer la membrane des cellules eucaryotes (Figure 7) pour y injecter des exoenzymes aux effets cytotoxique et antiphagocytaire.

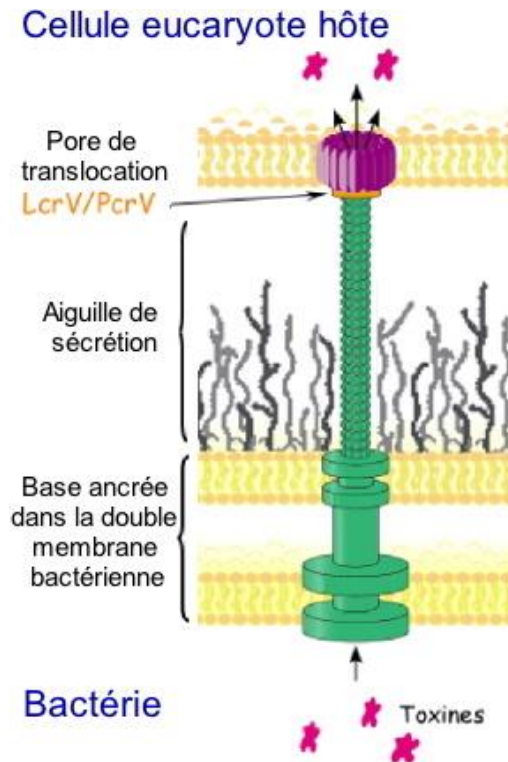


Figure 7 : schéma simplifié du système de sécrétion de type 3

- Les phospholipases C : enzymes extracellulaires contenant des ions zinc, elles ont un effet cytolytique local, en particulier sur l'épithélium pulmonaire ⁵⁹.
- Les protéases (protéase alcaline et protéase IV) : enzymes dégradant la fibrine, elles jouent un rôle prépondérant dans les infections oculaires et pulmonaires.

Enfin, certaines molécules sont impliquées dans l'infection chronique par des mécanismes de persistance et d'échappement immunitaire :

- La pyoverdine est le sidérophore majeur de *Pseudomonas aeruginosa* ; son rôle de chélateur du fer est essentiel pour la croissance et la persistance bactériennes ⁶⁰.
- L'alginate : ce polysaccharide extracellulaire est responsable du phénotype muqueux. Il confère un avantage en inhibant la phagocytose, l'action des antibiotiques et la réponse immunitaire ⁶¹, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose.
- Le biofilm : matrice extracellulaire composée en majorité d'exopolysaccharides, l'organisation des bactéries entre elles y est particulière, avec notamment un ralentissement du métabolisme de plus en plus important lorsque l'on s'éloigne de la surface du biofilm. Cette organisation facilite la survie au long cours au sein d'un environnement hostile ⁶².

I.2.4. Résistances aux antibiotiques

I.2.4.1. Résistances naturelles

Pseudomonas aeruginosa est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques du fait d'une faible perméabilité membranaire et d'un important équipement enzymatique. Cet

équipement comprend une céphalosporinase inducible AmpC, une oxacillinase à spectre restreint OXA-50 et des systèmes d'efflux actifs MexAB-OprM⁶³ et MexXY-OprM⁶⁴.

Ainsi, le phénotype sauvage montre une résistance à l'amoxicilline seule et en association avec l'acide clavulanique, aux céphalosporines de première et deuxième générations, à la ceftriaxone et au céfotaxime, mais aussi à l'ertapénème.

Par ailleurs, le triméthoprime, le chloramphénicol, les macrolides et apparentés, les cyclines (y compris la tigécycline), la nitrofurantoïne, le métronidazole et certaines quinolones telles que l'acide nalidixique et l'ofloxacine sont inactifs sur cette espèce.

Il existe également une résistance naturelle à certains aminosides : kanamycine, néomycine, spectinomycine, par expression d'une aminoside-phosphotransférase : l'Aph(3')IIIb.

Par ailleurs, à l'instar de toutes les bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistant aux glycopeptides, aux oxazolidinones et à la daptomycine.

Les principaux antibiotiques susceptibles d'être actifs sur *Pseudomonas aeruginosa*, et donc testés en routine sont listés ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux antibiotiques testés en routine sur *Pseudomonas aeruginosa*, classés par familles

| β-lactamines | Aminosides | Quinolones | Autres |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| Ticarcilline | Gentamicine | Ciprofloxacine | Fosfomycine |
| Pipéracilline | Amikacine | Lévofloxacine | Colistine |
| Ticarcilline + Acide clavulanique | Tobramycine | | |
| Pipéracilline + Tazobactam | Nétilmicine | | |
| Ceftazidime | | | |
| Céfépime | | | |
| Imipénème | | | |
| Méropénème | | | |
| Aztréonam | | | |

Sur justification clinique et microbiologique, de nouvelles associations peuvent être testées : ceftolozane + tazobactam et ceftazidime + avibactam. Ces deux associations comprennent une céphalosporine de troisième génération et un inhibiteur de β-lactamases.

I.2.4.2 Résistances acquises

Les bactéries peuvent acquérir des résistances par le biais de différents mécanismes : mutation d'un gène chromosomique de résistance ou d'un gène régulateur de l'expression de ce-dernier, ou bien acquisition de matériel génétique portant des gènes de résistance non possédés par la bactérie à l'état sauvage (plasmides, transposons, intégrons)⁶⁵. Ces différents mécanismes peuvent s'additionner, d'où certains phénotypes bactériens dits multirésistants.

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la surproduction de la céphalosporinase AmpC par mutation du gène *ampC* donne lieu à une résistance à toutes les β -lactamines sauf les carbapénèmes ; c'est le plus fréquent des mécanismes de résistance à la ceftazidime et à l'association pipéracilline-tazobactam ⁶⁶. La surexpression de MexAB-OprM *via* des mutations des gènes régulateurs induit une résistance à la ticarcilline seule et associée à l'acide clavulanique, à l'aztréonam ainsi qu'aux fluoroquinolones ⁶⁷. La surexpression de MexXY-OprM se traduit par une résistance de bas niveau au céfépime, aux aminosides et aux fluoroquinolones ⁶⁸.

Le mécanisme de résistance le plus fréquent aux carbapénèmes en France est une mutation du gène *oprD* codant une porine qui constitue le canal d'entrée principal de ces molécules antibiotiques. Ce mécanisme donne lieu à un phénotype résistant à l'imipénème et au mérépénème, avec néanmoins une CMI plus basse pour ce-dernier qui peut rester sensible ⁶⁹.

La résistance à la colistine chez *Pseudomonas aeruginosa* est causée par une modification du lipide A du LPS par addition de molécules d'amino-arabinose ; elle est peu fréquente en France ⁷⁰. Enfin, des mutations des gènes *gyrA* et *parC* codant des sous-unités de la gyrase et de la topoisomérase IV entraînent une résistance isolée aux fluoroquinolones ⁷¹.

Outre ces mécanismes de résistance liés au matériel génétique intrinsèque de *Pseudomonas aeruginosa*, cette espèce peut acquérir des gènes de résistance extrinsèques par transfert horizontal, à partir d'autres individus ou de l'environnement. Ces gènes de résistance concernent potentiellement toutes les familles d'antibiotiques. A titre d'exemple, les carbapénémases sont les plus préoccupantes (VIM-2 et GES-5 étant majoritaires en France) ⁷²; mais il peut également s'agir de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), d'enzymes modificatrices d'aminosides, *etc.*

En conséquence, on voit apparaître des phénotypes de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants, voire totorésistants, en particulier au sein des populations exposées à une forte pression de sélection antibiotique. Malgré les nouvelles molécules actives contre cette espèce récemment mises sur le marché (cf *supra*), l'Organisation Mondiale de la Santé place *Pseudomonas aeruginosa* sur la liste des agents bactériens pour lesquels le développement de nouveaux antibiotiques est nécessaire de toute urgence ⁷³.

I.3. Les intégrons de résistance

Les intégrons de résistance sont des structures génétiques bactériennes capables de capturer et d'exprimer des gènes, notamment des gènes de résistance aux antibiotiques. Découverts en 1989 ⁵, ils ont d'abord été mis en évidence au sein de souches bactériennes issues de prélèvements en médecine humaine. Ils ont ensuite été recherchés et retrouvés dans des prélèvements vétérinaires et environnementaux. Ils sont majoritairement présents au sein du génome des bactéries à Gram négatif, mais certaines bactéries à Gram positif (*Corynebacterium spp* et apparentés) peuvent également en héberger ⁷⁴. Ils sont portés par des plasmides ou des transposons, et donc potentiellement transférés d'une bactérie à une autre, ce qui fait d'eux des acteurs majeurs de la dissémination de l'antibiorésistance.

Le lien entre intégrons et multirésistance a été maintes fois démontré dans différentes publications, y compris au sein de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ^{75, 76}. En conséquence,

leur détection pourrait constituer un élément important à prendre en compte dans la prise en charge du patient, et leur présence un facteur pronostic péjoratif au plan de l'évolution clinique.

I.3.1. Structure

Tous les intégrons ont en commun une partie conservée appelée région 5' CS (*conserved segment*) constituant une plateforme fonctionnelle permettant d'intégrer, d'exprimer et d'exciser des gènes sous forme de cassettes. Les cassettes se situent en aval de cette région : elles constituent la région variable d'un intégron (Figure 8).

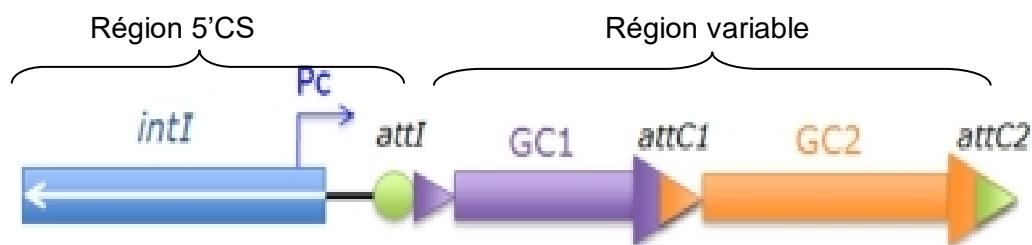


Figure 8 : structure d'un intégron

intI : gène de l'intégrase. Pc : promoteur des cassettes. *attI* : site d'attachement spécifique de l'intégrase. GC 1 : gene cassette 1. *attC1* : site spécifique de recombinaison de la cassette 1. GC 2 : gene cassette 2. *attC2* : site spécifique de recombinaison de la cassette 2

I.3.1.1 La région 5'CS

Cette région comprend le gène de l'intégrase *intI*, généralement orienté en sens inverse des autres éléments de l'intégron. La protéine IntI est une tyrosine recombinase spécifique de site qui catalyse des réactions de recombinaison entre le site *attI* d'une cassette et le site *attC* ou entre deux sites *attC* de deux cassettes. Selon la composition en acides aminés de l'intégrase, on dénombre à ce jour trois principales classes d'intégrons de résistance. Les intégrons de classe 1 sont les plus fréquemment isolés en contexte microbiologique clinique.

Le site *attI* est un site d'attachement spécifique de l'intégrase, par lequel les cassettes sont intégrées au réseau.

Enfin, le promoteur Pc a pour rôle d'assurer l'expression des gènes de cassettes, celles-ci étant en majorité dépourvues de promoteur propre. Plus une cassette est située près du Pc, plus le gène qu'elle héberge est exprimé de façon importante⁷⁷. Il existe plusieurs variants de Pc ; à titre d'exemple, au sein des intégrons de classe 1, on recense cinq variants principaux qui assurent à des degrés différents l'expression des cassettes en aval (on parle de promoteur plus ou moins fort ou faible). Ces variants sont distingués par des différences subtiles dans deux parties spécifiques de leurs séquences nucléotidiques, appelées boîte -35 et boîte -10 (Tableau 2). Chez les intégrons de classe 1, plus le variant du Pc est fort, plus l'activité de l'intégrase est faible et vice-versa⁷⁸.

Tableau 2 : Les principaux variants du promoteur Pc au sein des intégrons de classe 1

| Variants de Pc | Force relative | Séquence nucléotidique | |
|-----------------------|----------------|------------------------|-----------|
| | | Boîte -35 | Boîte -10 |
| PcW | 1 | TGGACA | TCNTAAGCT |
| PcH1 | 6 | TGGACA | TCNTAAACT |
| PcW _{TGN-10} | 18 | TGGACA | TGNTAAGCT |
| PcH2 | 20 | TTGACA | TCNTAAGCT |
| PcS | 25 | TTGACA | TCNTAAACT |

PcW : Pc Weak. PcH1 : Pc hybride 1. PcW_{TGN-10} : Pc Weak avec un motif TGN dans la boîte -10.

PcH2 : Pc hybride 2. PcS : Pc Strong.

I.3.1.2. La région variable

En aval de la plateforme fonctionnelle 5'CS, les cassettes forment la région variable des intégrons. Les cassettes sont constituées d'un cadre ouvert de lecture (ORF) et d'un site *attC*. Les gènes de cassettes codent le plus souvent des résistances aux antibiotiques, quasiment toutes les familles d'antibiotiques étant concernées⁷⁹. Certaines cassettes hébergent des gènes codant des protéines de fonction encore inconnue. Les intégrons de résistance contiennent moins d'une dizaine de cassettes, mesurant en moyenne 1kb chacune et dont les sites *attC* sont très différents les uns des autres.

En aval de ce réseau se trouve souvent, mais pas toujours, une région appelée 3'CS (*conserved segment*) qui comporte chez les intégrons de classe 1 le gène *qacEΔ1* codant une résistance aux ammoniums quaternaires, le gène *sul1* codant une résistance aux sulfamides et le gène *orf5* codant une protéine de fonction inconnue.

I.3.2. Mécanistique

I.3.2.1 L'activité de l'intégrase

L'expression de l'intégrase est sous la dépendance de la réponse SOS bactérienne⁸⁰. Cette réponse est déclenchée lors de la détection, au sein du corps bactérien, d'ADN simple brin témoignant d'une lésion de l'ADN bicaténaire. L'ADN simple brin se combine à la protéine RecA pour induire l'autoprotéolyse d'une autre protéine : LexA. Cette dernière est fixée, à l'état basal, sur le promoteur de l'intégrase Pint situé entre le promoteur Pc et le site *attI*. La dénaturation de LexA permet donc l'expression de l'intégrase, et ainsi le recrutement et/ou l'excision de cassettes au sein du réseau (Figure 9). La réponse SOS est induite par de nombreux facteurs de stress environnementaux physiques (UV, radicaux libres, élévations de pression...) mais aussi par la présence de certains antibiotiques tels que les β-lactamines, les quinolones, le métronidazole et le triméthoprime^{81, 10}.

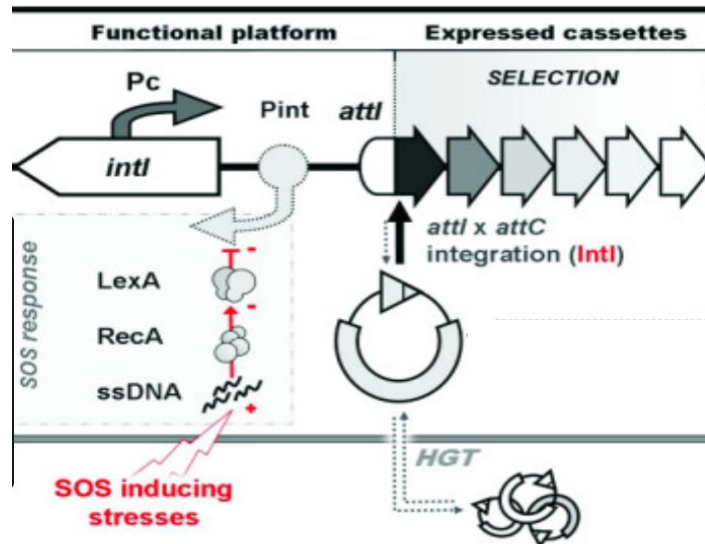


Figure 9 : réponse SOS bactérienne entraînant l'expression de l'intégrase.

D'après Cambray *et al.* 2011

I.3.2.2. Les réarrangements de cassettes

Le site *attC*, propre à chaque cassette, est un site spécifique de recombinaison reconnu par l'intégrase *IntI*. Les cassettes peuvent être intégrées au réseau de cassettes grâce à l'intégrase, le plus souvent par recombinaison entre le site *attI* et un site *attC* ; lorsque les cassettes sont excisées, la recombinaison s'effectue plus fréquemment entre deux sites *attC* (Figure 10).

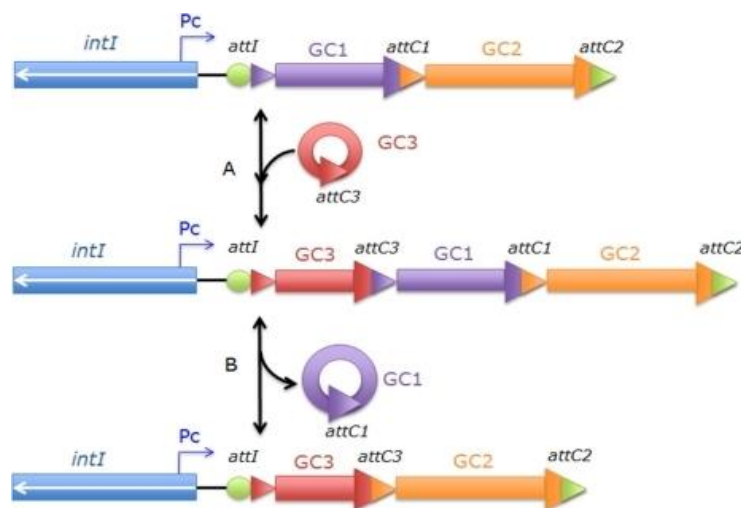


Figure 10 : insertion (A) et excision (B) de cassettes au sein d'un intégron

intI : gène de l'intégrase *IntI*. *Pc* : promoteur des cassettes. *attI* : site d'attachement spécifique de l'intégrase. GC 1 : gene cassette 1. *attC1* : site spécifique de recombinaison de la cassette 1. GC 2 : gene cassette 2. *attC2* : site spécifique de recombinaison de la cassette 2. GC 3 : gene cassette 3. *attC3* : site spécifique de recombinaison de la cassette 3

De tels réarrangements ont été mis en évidence *in vitro* à de nombreuses reprises ^{6, 7, 8, 9}, mais une seule publication à ce jour a décrit ce phénomène *in vivo* ¹⁰. Les auteurs ont retrouvé au sein du génome d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir de prélèvements respiratoires d'un patient en Hématologie Clinique, un intégron de classe 1 hébergeant notamment la cassette *bla*_{OXA-28} dont le gène code une BLSE. Sur un premier prélèvement était insérée en amont de la cassette *bla*_{OXA-28} une cassette *gcuF1* de fonction inconnue. Il en résultait la synthèse d'une protéine de fusion ne conférant pas en elle-même de résistance aux β-lactamines. Seule une faible proportion de cette protéine hybride pouvait être clivée à la jonction des séquences peptidiques GCUF1 et OXA-28, conférant ainsi une résistance résiduelle à la ceftazidime, sans toutefois que la souche bactérienne ne soit interprétée comme résistante. Sur un second prélèvement effectué vingt-huit jours plus tard, la cassette *gcuF1* avait été excisée du réseau mais pas la cassette *bla*_{OXA-28} (Figure 11) ; il en résultait une expression pleine et entière de la protéine OXA-28 seule, conférant ainsi une résistance à la ceftazidime détectée comme telle par un antibiogramme.

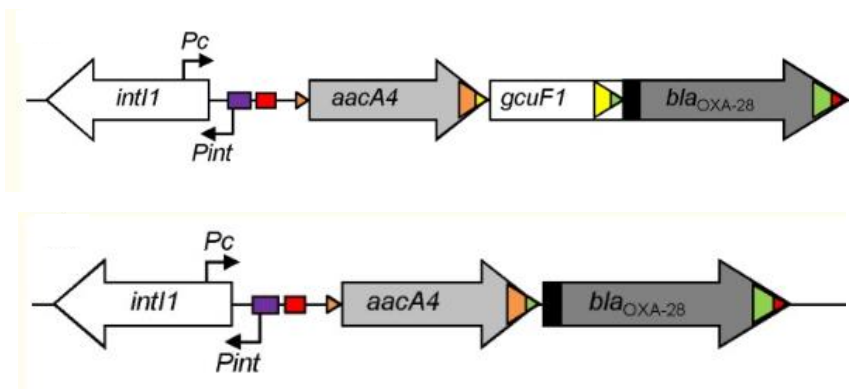


Figure 11 : réarrangement observé *in vivo* au sein d'un réseau de cassettes d'intégron de classe 1

D'après Hocquet *et al.* 2012

Ce patient avait bien reçu une antibiothérapie par ceftazidime, cependant dans ce cas précis, les auteurs ont démontré que la réponse SOS bactérienne n'avait pas été déclenchée par cet antibiotique, mais par la présence de métronidazole administré concomitamment à la ceftazidime.

I.4. Objectifs

L'objectif principal de notre travail était de rechercher, pour différents patients exposés aux antibiotiques, des réarrangements de cassettes d'intégrons de classe 1 au sein de souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées chez un même patient au cours du temps.

Les objectifs secondaires de ce travail étaient d'étudier les différents variants du Pc rencontrés au sein de ces intégrons, d'analyser les caractéristiques clonales des différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*, mais également de caractériser pour chaque souche les gènes de résistance acquis de façon extrinsèque en dehors des réseaux de cassettes d'intégrons.

II. Matériel et méthodes

II.1. Provenance des souches bactériennes analysées

Pour ce travail, 28 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été étudiées, pour lesquelles la présence d'un intégron de classe 1 avait été préalablement objectivée par qPCR ⁸².

Ces souches étaient issues de 4 patients atteints de mucoviscidose suivis au CHU de Limoges en Pathologie Respiratoire et en Pédiatrie, ainsi que de 6 patients intubés sous ventilation mécanique hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges.

Les dates de prélèvement de chacune des souches ainsi que les patients correspondant sont listés dans le Tableau 3. Pour chaque patient, au moins 2 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été analysées.

Tableau 3 : Souches, patients correspondant et dates de prélèvements

| Contexte clinique | Patients | Souches | Dates prélèvements |
|---|-------------|---------|--------------------|
| Intubation/ Ventilation mécanique | Patient A | R1 | 29/07/2011 |
| | | R2 | 23/11/2011 |
| | Patient B | R3 | 15/07/2016 |
| | | R4 | 27/07/2016 |
| | Patient C | R5 | 19/07/2013 |
| | | R6 | 26/07/2013 |
| | | R7 | 13/08/2013 |
| | Patient D | R8 | 24/01/2017 |
| | | R9 | 14/02/2017 |
| | | R12 | 15/02/2017 |
| | Patient E | R10 | 15/01/2017 |
| | | R11 | 31/01/2017 |
| | | R13 | 02/03/2017 |
| | Patient F | R14 | 31/01/2018 |
| | | R15 | 03/03/2018 |
| | | R16 | 03/03/2018 |
| Mucoviscidose | Patient PH | PH | 02/02/2007 |
| | | PH41 | 27/07/2007 |
| | Patient MM | MM23 | 23/09/2013 |
| | | MM32 | 03/11/2014 |
| | | MM41 | 20/04/2015 |
| | | MM49 | 11/12/2015 |
| | Patient LL | LL20 | 17/12/2014 |
| | | LL22 | 16/06/2015 |
| | | LL26 | 16/12/2015 |
| | Patient MMy | MMy5 | 12/06/2015 |
| | | MMy9 | 04/09/2015 |
| | | MMy11 | 23/10/2015 |

Les souches de patients atteints de mucoviscidose ont été nommées d'après les initiales du patient correspondant suivi d'un nombre servant à identifier la souche de façon chronologique

parmi tous les prélèvements subis par le patient. Lorsque plus de 2 souches étaient disponibles pour un même patient, afin de couvrir la période chronologique la plus longue possible, nous avons sélectionné la première et la dernière des souches prélevées, ainsi qu'une à deux souches issues de prélèvements intermédiaires.

Les souches de patients de Réanimation ont été nommées par la lettre R (pour Réanimation) suivie d'un nombre permettant de les identifier de façon plus précise. Dans cette population, nous avons utilisé toutes les souches disponibles pour un même patient (au nombre de 2 à 3 par patient), la période de temps étant plus restreinte.

Toutes ces souches étaient issues de prélèvements effectués au niveau de l'appareil respiratoire : lavage broncho-alvéolaire, aspiration bronchique, aspiration endotrachéale ou expectoration.

Les patients porteurs de ces souches appartenaient à des populations potentiellement très fortement exposées à la pression de sélection antibiotique car recevant des antibiothérapies fréquentes et/ou à spectre large. Lorsque cela était possible, nous avons recensé pour chaque patient les traitements antibiotiques prescrits autour de la période pendant laquelle les prélèvements ont été effectués. Ces données figurent en annexes 1 à 8. A noter que pour les patients A et PH, ces informations n'ont pu être recueillies car trop anciennes.

II.2. Etude du phénotype de résistance

Le phénotype de résistance aux antibiotiques de chacune des souches a été analysé par antibiogramme par diffusion en milieu gélosé selon la méthode des disques après ensemencement sur gélose en milieu de Müller-Hinton (Figure 12), ou bien au moyen de bandelettes Etest[®], ou encore *via* un antibiogramme en milieu liquide réalisé à l'aide de l'automate Vitek[®]2. Le caractère sensible, intermédiaire ou résistant de chaque souche à chaque antibiotique a été déterminé en milieu gélosé par mesure du diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour de chaque disque d'antibiotique selon les recommandations de l'European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

83.

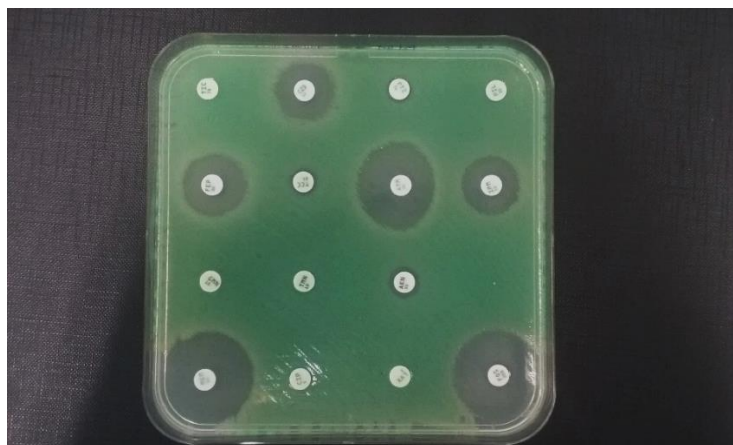


Figure 12 : antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques)

II.3. Extraction de l'ADN total des souches bactériennes

L'ADN total des 28 souches bactériennes a été extrait à l'aide de l'automate SaMag™ (Sacace Biotechnologies), conformément aux instructions du fabricant. Les ADN totaux ont ensuite été dosés au fluoromètre Qubit® afin de déterminer leur concentration, information importante et nécessaire pour l'étape suivante de préparation des bibliothèques.

II.4. Séquençage haut débit

Depuis la fin des années 2000 sont apparus de nouveaux automates pour le séquençage de l'ADN dits de 2^{ème} génération, opérant en parallèle sur un très grand nombre de séquences courtes, avec des débits environ 1000 fois supérieurs à ceux des séquenceurs précédents de 1^{ère} génération. C'est pourquoi cette méthode est appelée « séquençage haut débit » ou « séquençage nouvelle génération » (NGS : *Next Generation Sequencing*). Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé la technologie Ion Proton™ (Thermo Fisher Scientific).

Préalablement au NGS, des étapes spécifiques de préparation de l'ADN sont nécessaires.

II.4.1 Préparation des bibliothèques

Cette étape consiste en la fragmentation enzymatique de l'ADN total en séquences courtes de 100 à 400 pb, auxquelles sont fixées deux séquences adaptatrices : une séquence P1 et une séquence A identiques pour tous les échantillons, ainsi qu'une séquence supplémentaire appelée « *barcode* » spécifique de chaque échantillon (Figure 13).



Figure 13 : ADN fragmenté lié aux séquences adaptatrices A et P1

Pour notre travail, nous avons constitué des bibliothèques de 300 pb environ à l'aide de l'automate AB Library Builder™ System (Thermo Fisher Scientific) à partir de 100 ng d'ADN total pour chaque souche bactérienne, en suivant les instructions préconisées par le fournisseur.

L'étape suivante, consistant en une courte amplification sur 8 cycles, a été faite manuellement avec pour 25 µL d'ADN fragmenté lié aux séquences A et P1, 100 µL de Platinum® Supermix High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) et 5 µL de Library Amplification Primer Mix, un mélange d'amorces ciblant les séquences A et P1.

Les bibliothèques ont ensuite subi une purification par billes magnétiques Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc). Un contrôle de qualité des bibliothèques a été effectué (vérification de la taille des fragments et concentration en pmol/L) à l'aide de l'outil BioAnalyzer® 2100 (Agilent).

Enfin, l'ensemble des bibliothèques obtenues a été mélangé de façon équimolaire à la concentration de 100 pmol/L. Les étapes suivantes ont été réalisées par les ingénieurs de la plateforme hospitalo-universitaire d'acides nucléiques Biscem.

II.4.2 Amplification clonale par PCR émulsion (Plateforme Biscem)

Il s'agit d'une PCR réalisée au sein d'une émulsion comportant une phase aqueuse et une phase huileuse, afin que se forment des micro-gouttelettes (ou micro-réacteurs) contenant les réactifs de la PCR ainsi que les « *ion sphere particles* » (ISP). Un fragment d'ADN se fixe sur une ISP par l'adaptateur P1 ; l'amplification se fait grâce à une amorce biotinylée ciblant la séquence A (Figure 14). La réaction s'effectue en conditions limitantes, l'objectif étant d'obtenir le maximum d'ISP monoclonales et le minimum d'ISP nues et polyclonales (lorsque plusieurs fragments d'ADN différents se fixent sur une même ISP au départ).

Par la suite, lors de l'étape d'enrichissement, l'amorce biotinylée est captée par des billes de streptavidine ; les ISP nues sont donc éliminées après lavage. Puis, l'ADN est dénaturé par de la soude, ce qui permet de récupérer des ISP recouvertes de segments d'ADN monocaténaire.

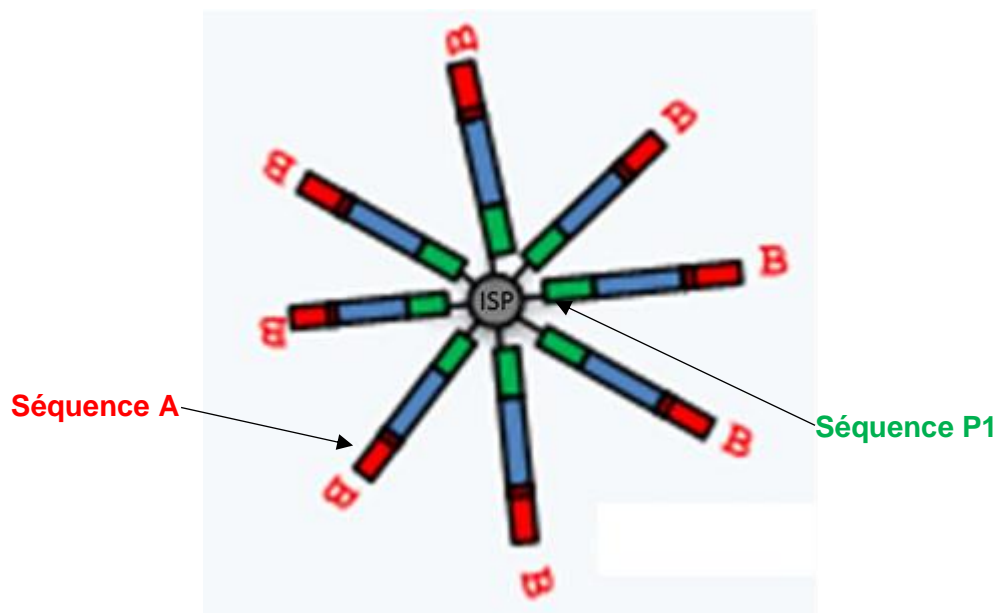


Figure 14 : une « *ion sphere particle* » (ISP) monoclonale avec amorces biotinylées

II.4.3. Réaction de séquençage par technologie Ion Proton™ (Plateforme Biscem)

Cette technologie repose sur la détection de protons (H^+) libérés lors de l'incorporation d'un dNTP par la polymérase. Il résulte de cette libération un changement de pH et un signal électrique, qui est détecté par une puce semi-conductrice comportant plusieurs millions de puits. Théoriquement, chaque puits contient une ISP. La puce est mise en contact avec les

quatre nucléotides A, T, C, G l'un après l'autre (Figure 15) ; le séquençage s'effectue depuis la séquence A jusqu'à la séquence P1.

Pour notre travail, deux puces ont été utilisées afin de séquencer l'ensemble de nos souches.

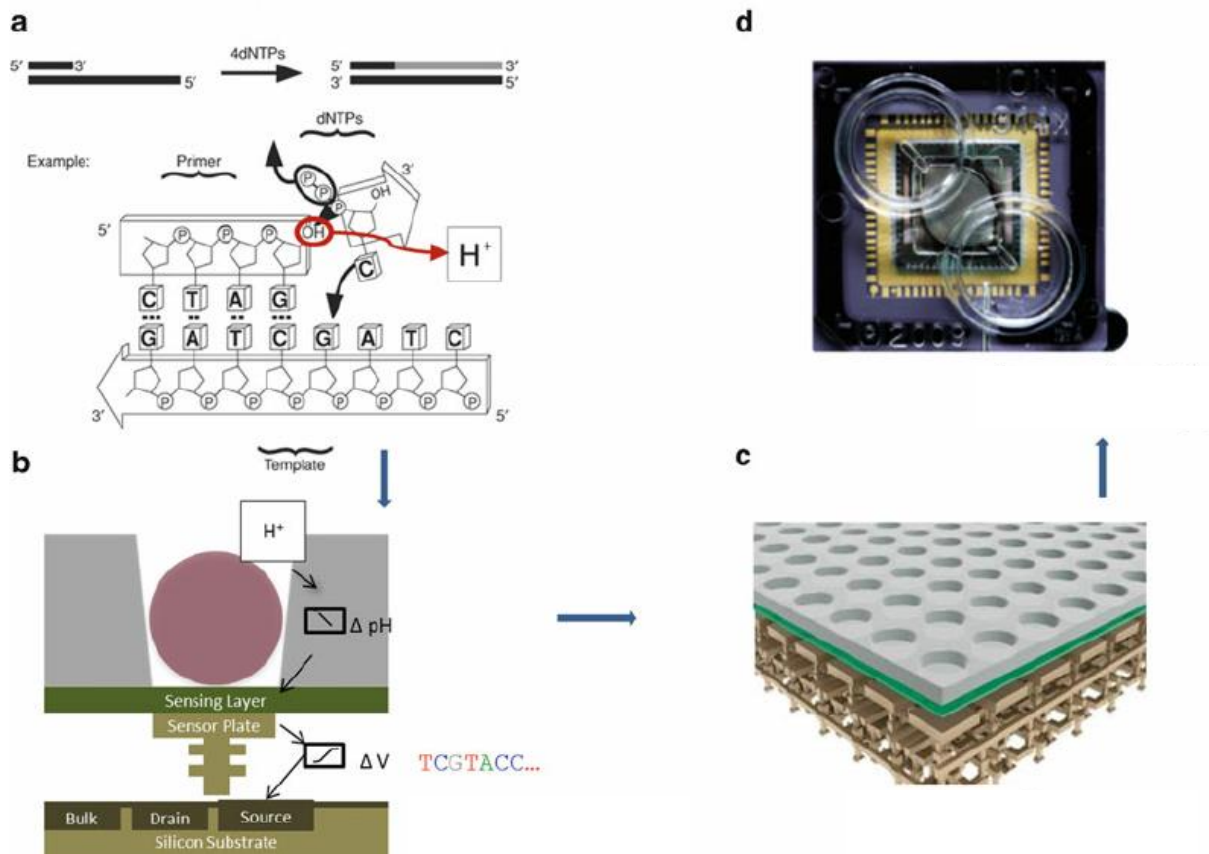


Figure 15 : schéma de fonctionnement du séquençage par la technologie Ion Proton™

- a** : addition d'un nucléotide lors de la synthèse du brin d'ADN complémentaire, libérant un proton.
- b** : détection par un capteur de pH en silicone. **c** : vue en coupe d'une puce constituée de millions de capteurs recouverts par des micro-puits. **d** = photographie d'une puce

II.5. Post-traitement des données et analyse bioinformatique

A la fin de la réaction, les données brutes ont été transférées vers un serveur informatique où elles ont été converties en lettres A, T, G, C. Des millions de séquences d'environ 200 pb appelées « reads » ont été générées. Afin d'apprécier la qualité de ces données, nous avons comparé l'ensemble des reads obtenus pour chaque génome à un génome de *Pseudomonas aeruginosa* de référence : PAO1 (accession number : AE004091). Un score de couverture d'au moins 20 à 50X témoignait d'une bonne qualité des données de séquençage.

II.5.1. Assemblage des *reads* (Plateforme Biscem)

A l'aide du logiciel MIRA (Mimicking Intelligent Read Assembly), un assemblage des millions de *reads* a été réalisé selon l'approche *de novo* qui permet de recouper des séquences chevauchantes de différents *reads* de façon à assembler ceux-ci en centaines ou milliers de « *contigs* », plus longs et moins nombreux (Figure 16).



Figure 16 : assemblage des *reads* en *contigs*

II.5.2. Analyse bioinformatique

II.5.2.1. Caractérisation des réseaux de cassettes d'intégrons

Cette étape a été réalisée à l'aide du logiciel Geneious® (Biomatters). Face aux centaines, voire milliers, de *contigs* obtenus pour chaque souche, la méthodologie informatique employée a eu pour but de rechercher celui ou ceux comportant un intégron de classe 1. Plus précisément, nous avons recherché le gène de l'intégrase *intl1*, qui en est la composante stable et constante, accompagné du site *attI1*. Pour ce faire, nous avons isolé une séquence de région 5'CS d'un intégron de classe 1 à partir de la GenBank® (*accession number* : KY646160), la banque de séquences d'ADN en ligne du *National Institute of Health*. Puis nous avons utilisé la fonction « *map to reference* » du logiciel Geneious® (Figure 17). Une couverture de 60% minimum et une homologie de séquence supérieure ou égale à 99% permettaient d'identifier formellement une région 5'CS.

Une fois le site *attI1* repéré sur l'un des *contigs*, nous avons sélectionné le fragment du *contig* en aval de ce site (fragment qui correspondait donc selon toute vraisemblance au réseau de cassettes) et ce sur 10 kb environ, longueur maximale d'un réseau d'intégron de classe 1. Puis nous avons comparé ce fragment de *contig* à l'ensemble des séquences nucléotidiques de la GenBank® à l'aide de l'outil Blast, afin de déterminer la ou les cassette(s) dont il était composé. Une couverture de 90 % minimum et une homologie de séquence supérieure ou égale à 99% permettaient d'identifier formellement une cassette. La caractérisation du réseau prenait fin lorsqu'une région 3'CS était rencontrée.

Le site *attI1* pouvait être repéré à deux occurrences sur des *contigs* différents, ce qui nous orientait vers la présence de deux intégrons de classe 1 au sein du génome concerné ; de fait les séquences en aval de chaque occurrence d'*attI1* étaient analysées.

Lorsque la séquence en aval d'un site *attI1* mesurait moins de 10 kb, nous l'avons analysée au maximum de sa longueur, puis nous avons sélectionné les 300pb terminales et recherché la présence de ces 300 pb au début d'un autre *contig* grâce à la fonction *map to reference* afin d'analyser la suite du réseau étudié. Une autre méthode a consisté à rechercher la présence

d'une région 3'CS (*accession number* : AF133699) (couverture de 60% minimum et homologie de séquence supérieure ou égale à 99%) et à analyser la séquence en amont sur 10 kb (ou sur la longueur permise par la taille du *contig*), jusqu'à la rencontre d'une région 5'CS ou l'extrémité du *contig*, selon la situation.

Cette opération a été effectuée pour chacune des 28 souches.

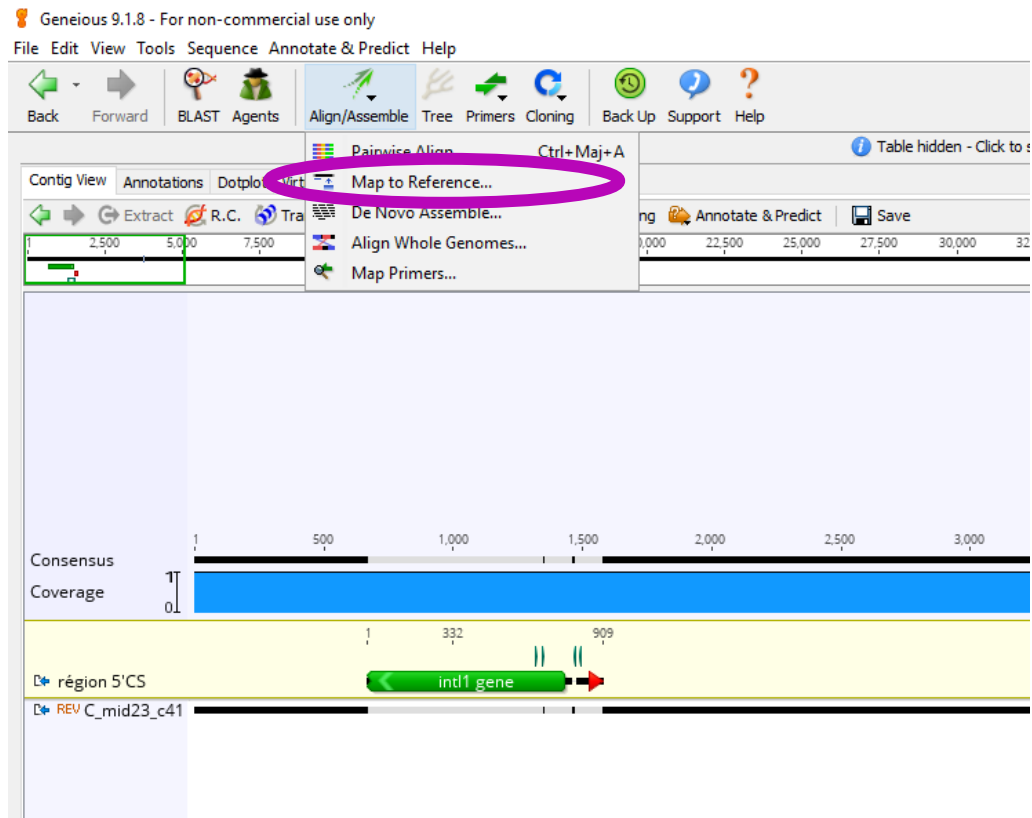


Figure 17 : capture d'écran lors de l'utilisation de la fonction « *map to reference* » du logiciel Geneious® (Biomatters).

A été trouvée sur le contig n° 41 (c41) une séquence analogue à notre région 5'CS de référence (gène *intl1* en vert, site *att1* en rouge)

II.5.2.2. Etude des variants de Pc

Sur notre région 5'CS de référence (KY646160), les boîtes -35 et -10 du promoteur Pc étaient annotées ; il s'agissait du variant Pch1. Afin de comparer de façon exacte la séquence nucléotidique du Pc de chacun de nos intégrons à la séquence de notre région 5'CS de référence, toujours grâce au logiciel Geneious® (Biomatters), nous avons aligné ces deux séquences (Figure 18).

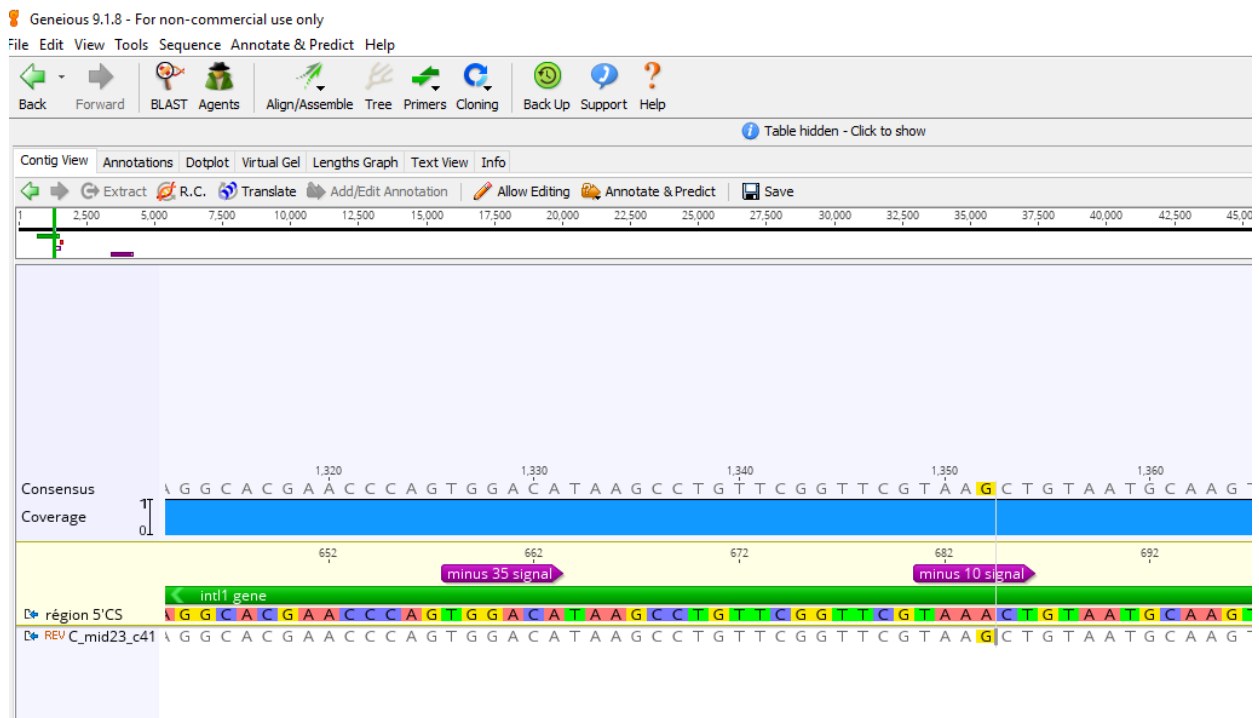


Figure 18 : capture d'écran lors d'alignements des séquences Pc dans le logiciel Geneious® (Biomatters)

Alignement de la séquence de notre région 5'CS de référence (gène *int1* en vert, boîtes -35 et -10 du PcH1 en violet) et du contig 41 (c41). En jaune sur notre contig, on trouve une base G dans la boîte -10 au lieu d'une base A dans la séquence 5'CS de référence. Dans cet exemple, il s'agit d'un PcW.

II.5.2.3. Analyse de la clonalité des souches

Après avoir étudié les réseaux de cassettes, il était nécessaire de s'assurer que les différentes souches isolées chez un même patient appartenaient bien au même clone.

A cet effet, nous avons effectué plusieurs analyses complémentaires. Tout d'abord, nous avons déterminé le sérotype de chacune des souches en soumettant l'ensemble des *contigs* de chaque souche à l'outil Past 1.0 (*Pseudomonas aeruginosa* serotyping) de la plateforme en ligne du Center for Genomic Epidemiology (CGE) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PAst/>).

Dans un second temps, nous avons effectué un *Multilocus Sequence Typing* (MLST) sur les *contigs* de chaque souche au moyen de l'outil MLST 2.0 de la plateforme du CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>), en sélectionnant l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

La méthode MLST consiste à comparer entre différentes souches d'une même espèce les allèles de plusieurs gènes codant des protéines indispensables à la survie de cette espèce ; les gènes utilisés pour le MLST (dits « gènes de ménage » ou « *housekeeping genes* ») sont au nombre de 7 chez *Pseudomonas aeruginosa* : acétyl-coA-synthétase, shikimate déshydrogénase, GMP synthétase, enzyme de réparation de l'ADN MutL, NADH déshydrogénase I, phosphoenol-pyruvate synthétase et composant I de l'anthralite synthétase⁸⁴. Plus le nombre d'allèles identiques entre deux souches est élevé, plus les souches sont proches phylogénétiquement.

Enfin, afin d'asseoir ces données concernant la clonalité, nous avons construit deux arbres phylogénétiques à partir de l'ensemble des données NGS : l'un pour les souches issues de patients atteints de mucoviscidose, l'autre pour les souches issues de patients de Réanimation. Pour ce faire, nous avons utilisé la plateforme en ligne RealPhy (*Reference sequence Alignment based Phylogeny*) du *Swiss Institute of Bioinformatics* (<https://realphy.unibas.ch/fcgi/realphy>) ; nous avons choisi le génome PAO1 comme séquence de référence.

II.5.2.4. Recherche de gènes de résistance acquis hors intégrons

Il nous a paru également intéressant d'étudier pour chaque souche l'ensemble des gènes de résistance acquis ne se présentant pas sous la forme de cassettes d'intégrons, afin d'y rechercher d'éventuelles modifications au cours du temps. Cette analyse a été réalisée grâce à l'outil ResFinder 3.0 de la plateforme en ligne du CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Une couverture de 30% minimum et une homologie de séquence de 100% permettaient d'identifier formellement un gène de résistance donné.

III. Résultats

III.1. Phénotypes de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats des antibiogrammes de chacune des souches sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Phénotypes de résistance des 28 souches de *Pseudomonas aeruginosa*

| Contexte clinique | Patients | Souches | P | T | T | T | A | I | M | C | F | A | T | G | N | C | C | L | F | C | C | |
|--|-------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| | | | IP | ZP | IC | CC | CT | CM | TP | MM | EA | EP | AN | OB | GM | NET | CS | PI | LEV | FOS | C/T | CAZ |
| Intubation / Ventilation mécanique | Patient A | R1 | R | R | R | R | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | |
| | | R2 | R | R | R | R | R | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | Patient B | R3 | R | R | R | R | I | S | S | S | R | R | S | R | R | S | S | S | R | R | S | S |
| | | R4 | R | R | R | R | I | R | R | R | I | S | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | Patient C | R5 | R | R | R | R | I | I | S | S | S | R | R | R | R | R | S | S | R | R | S | S |
| | | R6 | R | R | R | R | I | I | S | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | S | S |
| | | R7 | R | R | R | R | I | R | I | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | S | S |
| | Patient D | R8 | S | S | R | R | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | | R9 | S | S | R | R | I | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | | R12 | S | S | R | R | I | R | I | S | S | S | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | Patient E | R10 | R | R | R | R | I | S | S | R | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R | S | S |
| | | R11 | R | R | R | R | I | S | S | R | I | S | R | R | S | R | R | S | R | R | S | S |
| | | R13 | R | R | R | R | I | R | I | R | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R | S | S |
| | Patient F | R14 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | S |
| | | R15 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R |
| | | R16 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R |
| Mucoviscidose | Patient PH | PH | R | R | R | R | S | I | S | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | S | S | |
| | | PH41 | R | R | R | R | S | I | S | S | S | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | Patient MM | MM23 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | S | S |
| | | MM32 | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | S | S |
| | | MM41 | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | S | S |
| | | MM49 | S | S | S | S | S | I | I | S | S | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | Patient LL | LL20 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | | LL22 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | S | S |
| | | LL26 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | Patient MMy | MMy5 | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| | | MMy9 | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S |
| MMy11 | | R | R | R | R | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | R | R | S | S | |

PIP : pipéracilline. TZP : pipéracilline-tazobactam. TIC : ticarcilline. TCC : ticarcilline-acide clavulanique. ATM : aztréonam. IPM : imipénème. MEM : méropénème. CAZ : ceftazidime. FEP : céfépime. AN : amikacine. TOB : tobramycine. GM : gentamicine. NET : nétilmicine. CS : colistine. CIP : ciprofloxacine. LEV : lévofloxacine. FOS : fosfomycine. C/T : ceftolozane-tazobactam. CZA : ceftazidime-avibactam.

S : sensible. I : intermédiaire. R : résistant. Case grise : antibiotique non testé pour cette souche.

Les souches R15 et R16 étaient toutes deux résistantes à l'association ceftolozane-tazobactam, mais avec des CMI différentes mesurées par Etest® : CMI = 48 mg/L pour R15 et CMI > 256 mg/L pour R16.

III.2. Analyse qualitative et quantitative des données générées par le NGS

III.2.1. Analyse qualitative

La profondeur moyenne du séquençage a été estimée pour chacune des souches. Ce faisant, on obtient un score qui représente le nombre moyen de *reads* recouvrant chaque base du génome de *Pseudomonas aeruginosa* de référence, PAO1 (Tableau 5).

Tableau 5 : Score de profondeur moyenne de séquençage pour chaque souche sur le génome de référence PAO1

| | | Patients intubés ventilés | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------|---------------------------|--------|-----|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Souches | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | R8 | R9 | R12 | R10 | R11 | R13 | R14 | R15 | R16 |
| Profondeur moyenne | 325,3X | 22,4X | 115,6X | 72X | 21,6X | 38,9X | 23,2X | 142,9X | 86,6X | 52,8X | 607,4X | 144,8X | 48,1X | 51,6X | 45,7X | 44,3X |

| | | Patients atteints de mucoviscidose | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------|------------------------------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
| Souches | PH | PH41 | MM23 | MM32 | MM41 | MM49 | L20 | LL22 | LL26 | MMy5 | MMy9 | MMy11 |
| Profondeur moyenne | 202,8X | 67,1X | 72,4X | 42,2X | 103,2X | 116,1X | 41,6X | 64,5X | 182,9X | 90,9X | 180,9X | 32,6X |

III.2.2. Analyse quantitative

Dans le Tableau 6 est indiqué le nombre de *contigs* générés par le NGS pour chaque souche.

Tableau 6 : Nombre de contigs générés pour chaque souche

| | | Patients intubés ventilés | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----|---------------------------|-----|-----|------|------|------|------|-----|------|-----|-----|------|------|------|------|
| Souches | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | R8 | R9 | R12 | R10 | R11 | R13 | R14 | R15 | R16 |
| Nombre de contigs | 144 | 643 | 873 | 630 | 6702 | 4060 | 4270 | 1119 | 530 | 1037 | 273 | 968 | 1090 | 4406 | 2165 | 1485 |

| | | Patients atteints de mucoviscidose | | | | | | | | | | |
|-------------------|------|------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Souches | PH | PH41 | MM23 | MM32 | MM41 | MM49 | L20 | LL22 | LL26 | MMy5 | MMy9 | MMy11 |
| Nombre de contigs | 2639 | 9712 | 6976 | 2873 | 7030 | 4719 | 1789 | 1177 | 1637 | 7623 | 2706 | 9383 |

III.3. Caractérisation des réseaux de cassettes d'intégrons

III.3.1. Souches isolées des patients de Réanimation

III.3.1.1. Patient A

Les souches R1 et R2 issues du patient A possèdent toutes deux un intégron dont le réseau de cassettes est identique. Il s'agit d'un réseau de 3415 pb comportant 3 cassettes (Figure 19) :

- *aadA2* dont le gène code une aminoside-nucléotidyltransférase conférant une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine
- *bla_{OXA-4}* dont le gène code une β -lactamase de classe D (oxacillinase) à spectre étroit conférant une résistance à toutes les pénicillines, y compris en association avec un inhibiteur de β -lactamases, ainsi qu'aux céphalosporines de première génération.
- *cmlA1* dont le gène code une pompe d'efflux conférant une résistance au chloramphénicol



Figure 19 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches R1 et R2 (Patient A)

III.3.1.2. Patient B

Les souches R3 et R4 issues du patient B possèdent toutes deux un intégron dont le réseau de cassettes est identique. Il s'agit d'un réseau de 1367 pb comportant 2 cassettes (Figure 20) :

- *aacA4* dont le gène code une aminoside-acétyltransférase conférant une résistance à la kanamycine, la tobramycine, la nétilmicine, la gentamicine et l'amikacine
- *catB10* dont le gène code une acétyltransférase conférant une résistance au chloramphénicol

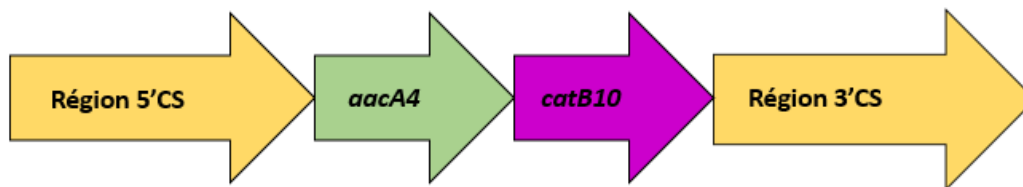


Figure 20 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches R3 et R4 (Patient B)

III.3.1.3. Patient C

Les souches R5, R6 et R7 issues du patient C possèdent toutes les trois un intégron dont le réseau de cassettes est identique. Il s'agit d'un réseau de 2550 pb composé de 3 cassettes (Figure 21) :

- *aacA4* (cf *supra*)
- *bla_{CARB-2}* dont le gène code une β -lactamase de classe A conférant une résistance aux carboxypénicillines dont la ticarcilline
- *aadA2* (cf *supra*)

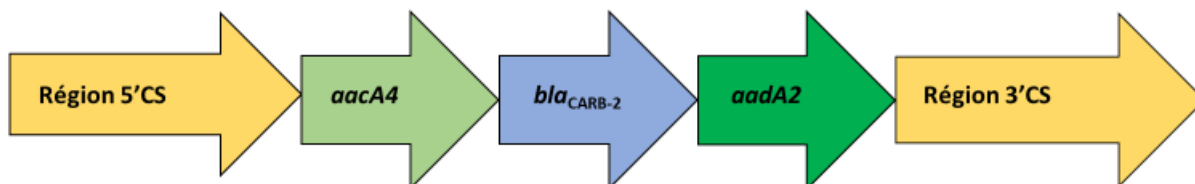


Figure 21 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches R5, R6 et R7 (Patient C)

III.3.1.4. Patient D

Les souches R8, R9 et R12 issues du patient D possèdent toutes les trois 3 intégrons.

L'intégron 1) est un intégron dont la région 5'CS, tronquée au niveau du site *attI*, est suivie d'une région 3'CS, tronquée également, comportant le gène *sul1* sans qu'il ne soit précédé par le gène *qacE Δ 1* (Figure 22).

L'intégron 2) est un intégron « vide », ne possédant pas de réseau de cassette (Figure 22).

L'intégron 3) possède un réseau de 642 pb composé de la cassette *aacA31* dont le gène code une aminoside-acétyltransférase conférant une résistance à la kanamycine, la tobramycine, la nétilmicine, la gentamicine et l'amikacine (Figure 22).

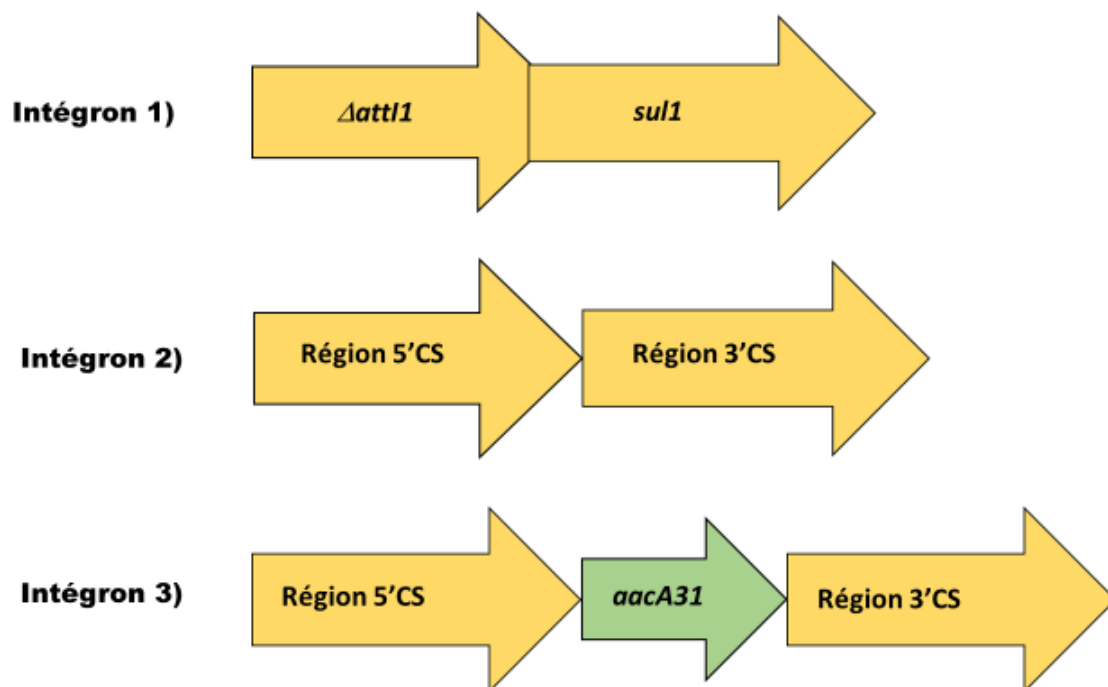


Figure 22 : réseaux de cassettes portés par les intégrons de souches R8, R9 et R12 (Patient D)

III.3.1.5. Patient E

Les souches R10, R11 et R13 issues du patient E possèdent toutes les trois un intégron dont le réseau de cassettes est identique. Il s'agit d'un réseau de 1743 pb composé de 3 cassettes (Figure 23) :

- *aadB* dont le gène code une aminoside-nucléotidyltransférase conférant une résistance à la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine.
- *gcuE6* dont le gène code une protéine de fonction encore inconnue et dont l'orf se termine dans la cassette suivante
- *aadA11* dont le gène code une aminoside-nucléotidyltransférase conférant une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine.



Figure 23 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches R10, R11 et R13 (Patient E)

III.3.1.6. Patient F

Les souches R14, R15 et R16 issues du patient F possèdent toutes les trois 2 intégrons.

L'intégron 1) possède un réseau de 1343 pb composé de 2 cassettes (Figure 24) :

- *aacA56* dont le gène code une aminoside-acétyltransférase conférant une résistance à la kanamycine, la tobramycine, la nétilmicine, la gentamicine et l'amikacine

- *aadB* (cf *supra*)

L'intégron 2) possède un réseau de 2340 pb composé de 2 cassettes (Figure 24) :

- *dfrB5* dont le gène code une dihydrofolate réductase conférant une résistance au triméthoprim

-*aadB* (cf *supra*) dont le site *attC* est partagé en deux par une séquence d'insertion ISPa62. Cette séquence est un élément génétique de 1382 pb capable de se transposer d'elle-même d'un endroit du génome à un autre. Au sein de notre réseau, elle se situe en sens inverse des cassettes.

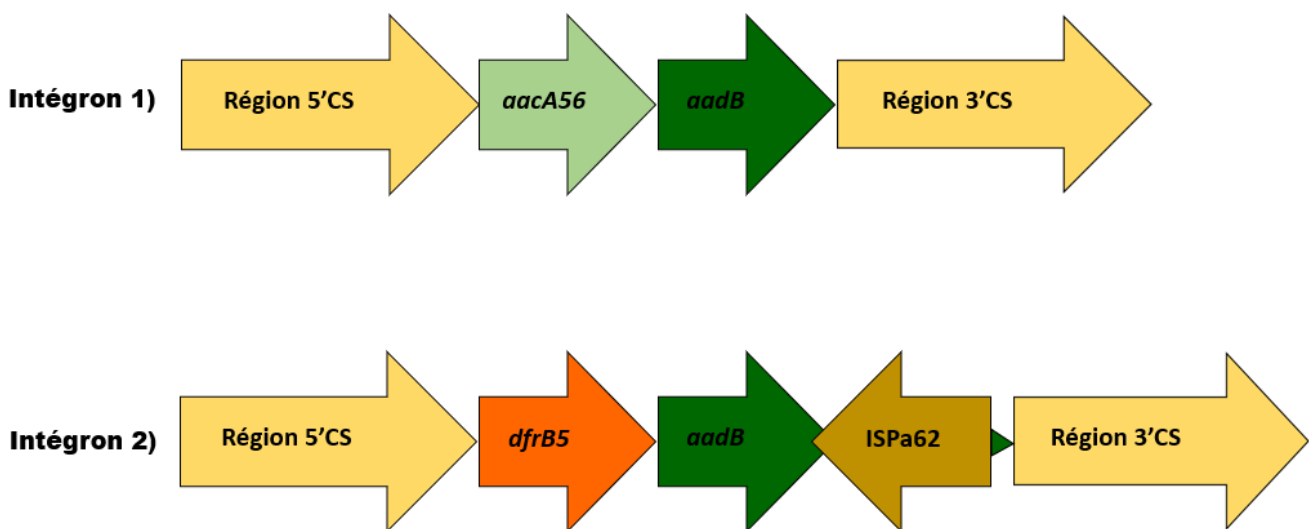


Figure 24 : réseaux de cassettes portés par les intégrons des souches R14, R15 et R16 (Patient F)

III.3.2. Souches isolées de patients atteints de mucoviscidose

III.3.2.1. Patient PH

Les souches PH et PH 41 issues du patient PH possèdent toutes deux 2 intégrons.

L'intégron 1) possède un réseau de 2539 pb composé de 3 cassettes (Figure 25) :

- *aacA4* (cf *supra*)

- *bla_{CARB-2}* (cf *supra*)

- *aadA2* (cf *supra*)

L'intégron 2) possède un réseau de 3143 pb composé de 3 cassettes (Figure 25) :

- *aacA4* (cf *supra*)

- *cmiB* dont le gène code une pompe d'efflux conférant une résistance au chloramphénicol

- *bla_{OXA-9}* dont le gène code une β -lactamase de classe D à spectre étroit conférant une résistance à toutes les pénicillines y compris en association avec un inhibiteur de β -lactamases, ainsi qu'aux céphalosporines de première génération.

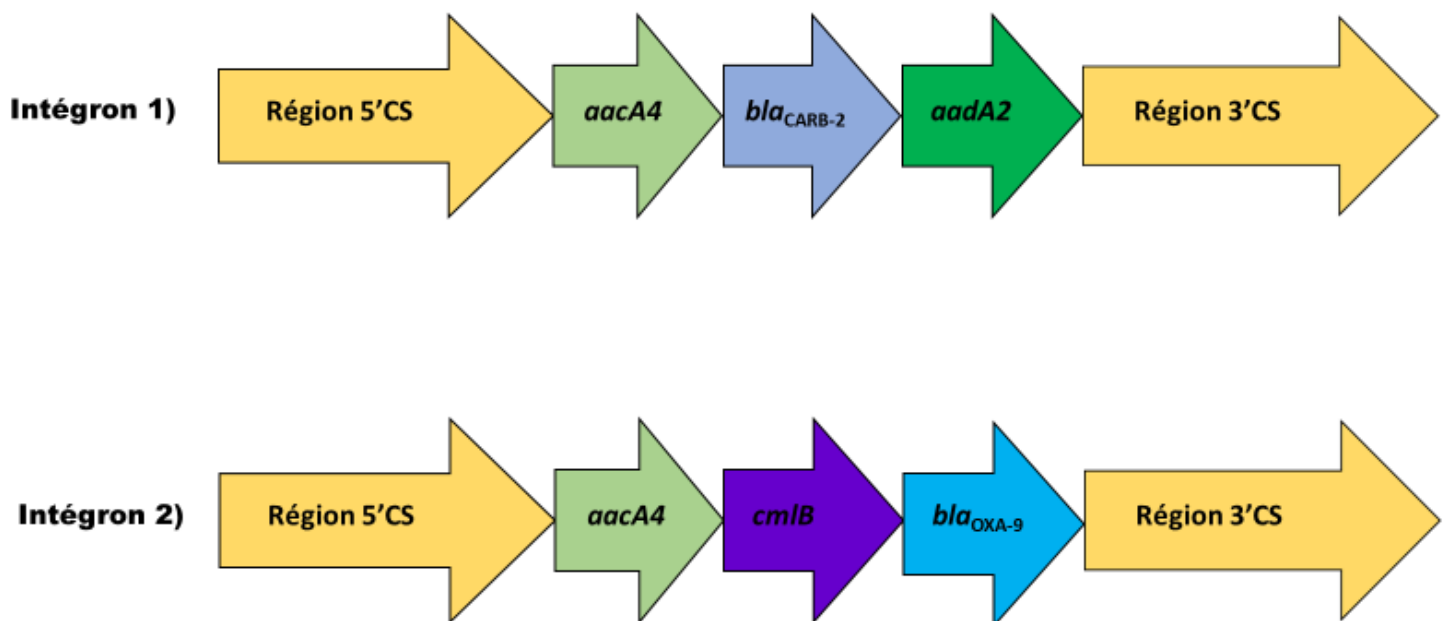


Figure 25 : réseaux de cassettes portés par les intégrons des souches PH et PH41 (Patient PH)

III.3.2.2. Patient MM

Les souches MM23, MM32, MM41 et MM49 issues du patient MM possèdent toutes les quatre un intégron dont le réseau de cassettes est identique. Il s'agit d'un réseau de 640 pb composé de la cassette *aacA4* (Figure 26).

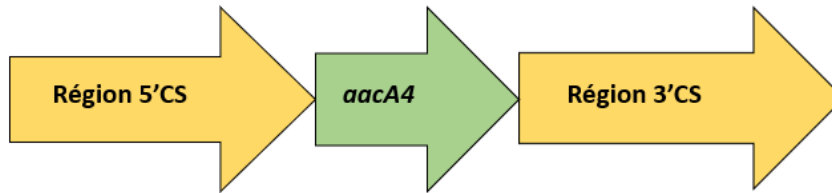


Figure 26 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches MM23, MM32, MM41 et MM49 (Patient MM)

III.3.2.3. Patient LL

Les souches LL20, LL22 et LL26 issues du patient LL possèdent toutes les trois un intégron dont le réseau de cassettes est identique. Il s'agit d'un réseau de 3251 pb composé de 4 cassettes (Figure 27) :

- *qacH* dont le gène code une pompe d'efflux conférant une résistance aux ammoniums quaternaires
- *aadB* (cf supra)
- *cmIA10* dont le gène code une pompe d'efflux conférant une résistance au chloramphénicol
- *aadA2* (cf supra)

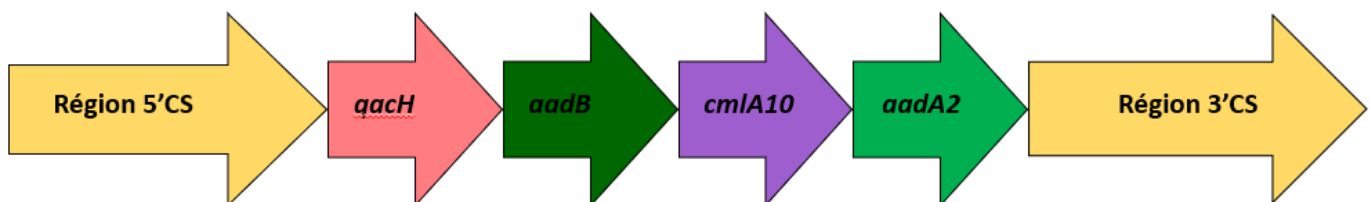


Figure 27 : réseau de cassettes porté par l'intégron des souches LL20, LL22 et LL26 (Patient LL)

III.3.2.4. Patient MMy

Les souches MMy5, MMy9 et MMy11 issues du patient MMy possèdent toutes les trois 2 intégrons.

L'intégron 1) possède un réseau de 861 pb composé de la cassette *aadA7* dont le gène code une aminoside-nucléotidyltransférase conférant une résistance à la streptomycine et la spectinomycine (Figure 28).

L'intégron 2 possède un réseau de 1467 pb composé de 2 cassettes :

- *bla_{OXA-10}* dont le gène code une β -lactamase de classe D à spectre étroit conférant une résistance à toutes les pénicillines y compris en association avec un inhibiteur de β -lactamases, ainsi qu'aux céphalosporines de première génération

- *aacA4* (cf *supra*)

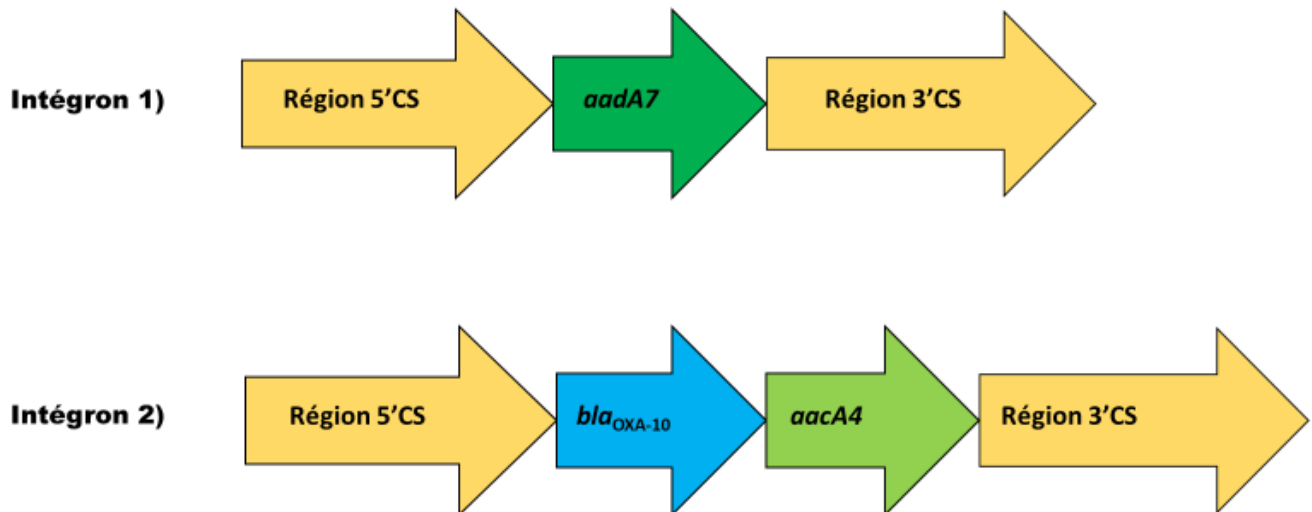


Figure 28 : réseaux de cassettes portés par les intégrons des souches MMy5, MMy9 et MMy11 (Patient MMy)

III.4. Recherche des différents variants du promoteur Pc

III.4.1. Souches issues de patient de Réanimation

Les variants de Pc pour chaque intégron de chacune des souches issues des patients intubés ventilés en Réanimation sont exposés dans le Tableau 7.

On ne constate pas de modification du variant de Pc pour un même intégron chez un même patient.

Tableau 7 : Variants de Pc pour chaque intégron de chacune des souches issues des patients de Réanimation

| Souches | Variants de Pc | | |
|---------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| R1 | PcH1 | | |
| R2 | PcH1 | | |
| R3 | PcW | | |
| R4 | PcW | | |
| R5 | PcW _{TGN-10} | | |
| R6 | PcW _{TGN-10} | | |
| R7 | PcW _{TGN-10} | | |
| R8 | Intégron 1) : PcH1 | Intégron 2) : PcH1 | Intégron 3) : PcW |
| R9 | Intégron 1) : PcH1 | Intégron 2) : PcH1 | Intégron 3) : PcW |
| R12 | Intégron 1) : PcH1 | Intégron 2) : PcH1 | Intégron 3) : PcW |
| R10 | PcW | | |
| R11 | PcW | | |
| R13 | PcW | | |
| R14 | Intégron 1) : PcH1 | Intégron 2) : PcH1 | |
| R15 | Intégron 1) : PcH1 | Intégron 2) : PcH1 | |
| R16 | Intégron 1) : PcH1 | Intégron 2) : PcH1 | |

PcH1 : Pc hybride 1. PcW : Pc Weak. PcW_{TGN-10} : Pc Weak avec un motif TGN dans la boîte -10.

III.4.2. Souches issues de patients atteints de mucoviscidose

Les variants de Pc pour chaque intégron de chacune des souches issues des patients atteints de mucoviscidose sont exposés dans le Tableau 8.

On ne constate pas de modification du variant de Pc pour un même intégron chez un même patient.

Tableau 8 : Variants de Pc pour chaque intégron de chacune des souches issues des patients atteints de mucoviscidose

| Souches | Variants de Pc | |
|--------------|-------------------------------------|--------------------|
| PH | Intégron 1) : PcW _{TGN-10} | Intégron 2) : PcS |
| PH41 | Intégron 1) : PcW _{TGN-10} | Intégron 2) : PcS |
| MM23 | PcS | |
| MM32 | PcS | |
| MM41 | PcS | |
| MM49 | PcS | |
| LL20 | PcH1 | |
| LL22 | PcH1 | |
| LL26 | PcH1 | |
| MMy5 | Intégron 1) : PcW | Intégron 2) : PcH1 |
| MMy9 | Intégron 1) : PcW | Intégron 2) : PcH1 |
| MMy11 | Intégron 1) : PcW | Intégron 2) : PcH1 |

PcH1 : Pc hybride 1. PcW : Pc Weak. PcW_{TGN-10} : Pc Weak avec un motif TGN dans la boîte -10.
PcS : Pc Strong

III.5. Etude de la clonalité des souches

III.5.1. Sérotypage

Les sérotypes correspondant à chacune des souches sont listés dans les Tableaux 9 et 10.

Les souches R1 et R2 appartiennent au sérotype O6.

Les souches R3 et R4 appartiennent au sérotype O11, ainsi que les souches R10, R11 et R13.

Les souches R5, R6 et R7 appartiennent au sérotype O12.

Les souches R8, R9 et R12 appartiennent au sérotype O4, ainsi que les souches R14, R15 et R16.

Les souches PH et PH41 appartiennent au sérotype O12.

Les souches MM23, MM32, MM41 et MM49 appartiennent au sérotype O11.

Les souches LL20, LL22 et LL26 appartiennent au sérotype O6.

Les souches MMy5, MMy9 et MMy11 appartiennent au sérotype O10.

Tableau 9 : Sérotype correspondant à chaque souche issue des patients de Réanimation

| Souches | Sérotypes |
|----------------|------------------|
| R1 | O6 |
| R2 | O6 |
| R3 | O11 |
| R4 | O11 |
| R5 | O12 |
| R6 | O12 |
| R7 | O12 |
| R8 | O4 |
| R9 | O4 |
| R12 | O4 |
| R10 | O11 |
| R11 | O11 |
| R13 | O11 |
| R14 | O4 |
| R15 | O4 |
| R16 | O4 |

Tableau 10 : Sérotype correspondant à chaque souche issue des patients atteints de mucoviscidose

| Souches | Sérotypes |
|----------------|------------------|
| PH | O12 |
| PH41 | O12 |
| MM23 | O11 |
| MM32 | O11 |
| MM41 | O11 |
| MM49 | O11 |
| LL20 | O6 |
| LL22 | O6 |
| LL26 | O6 |
| MMy5 | O10 |
| MMy9 | O10 |
| MMy11 | O10 |

III.5.2. Multilocus Sequence Typing

Les résultats du MLST sont exprimés pour chacune des souches dans les Tableaux 11 et 12.

Tableau 11 : Résultats du *Multilocus Sequence Typing* (MLST) pour les souches issues des patients de Réanimation

| Souches | Allèles | | | | | | | Sequence types |
|------------|------------------|------------------|--------|--------|-------|--------|------------------|----------------|
| R1 | acs_39 | aro_5 | gua_11 | mut_28 | nuo_4 | pps_4 | trp_63 (99,77%) | ST 379 ? |
| R2 | acs_39 | aro_5 | gua_11 | mut_28 | nuo_4 | pps_4 | trp_63 (99,77%) | ST 379 ? |
| R3 | acs_172 | aro_11 | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_4 | ST 235 |
| R4 | acs_172 | aro_11 | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_201 (99,32%) | ST 235 ? |
| R5 | acs_152 (99,49%) | aro_105 | gua_5 | mut_4 | nuo_4 | pps_4 | trp_3 (99,77%) | ST 111 ? |
| R6 | acs_17 | aro_105 | gua_5 | mut_4 | nuo_4 | pps_4 | trp_3 (99,77%) | ST 111 ? |
| R7 | acs_17 | aro_105 | gua_5 | mut_4 | nuo_4 | pps_4 | trp_3 (99,77%) | ST 111 ? |
| R8 | acs_28 | aro_22 | gua_5 | mut_3 | nuo_3 | pps_14 | trp_19 | ST 175 |
| R9 | acs_28 | aro_22 | gua_5 | mut_3 | nuo_3 | pps_14 | trp_19 (99,77%) | ST 175 ? |
| R12 | acs_28 | aro_22 | gua_5 | mut_3 | nuo_3 | pps_14 | trp_19 | ST 175 |
| R10 | acs_172 | aro_11 | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_201 (99,32%) | ST 235 ? |
| R11 | acs_172 | aro_11 | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_201 (99,32%) | ST 235 ? |
| R13 | acs_172 | aro_11 (99,8%) | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_4 | ST 235 ? |
| R14 | acs_17 | aro_125 (40,66%) | gua_26 | mut_3 | nuo_4 | pps_4 | trp_26 (99,77%) | ST 654 ? |
| R15 | acs_17 | aro_268 (68,47%) | gua_26 | mut_3 | nuo_4 | pps_4 | trp_26 | ST 654 ? |
| R16 | acs_17 | aro_5 | gua_26 | mut_3 | nuo_4 | pps_4 | trp_26 (99,77%) | ST 654 ? |

acs : gène de l'acétylcoenzyme-A synthétase. aro : gène de la shikimate déshydrogénase. gua : gène de la GMP synthétase. mut : enzyme MutL de réparation de l'ADN. nuo : gène de la NADH déshydrogénase I. pps : gène de la phosphoenol-pyruvate synthétase. trp : gène du composant I de l'antrilate synthétase

Lorsqu'un allèle n'avait pas été identifié avec 100% d'homologie, le pourcentage d'homologie est indiqué entre parenthèses en gras.

Lorsqu'un allèle n'avait pas été identifié avec 100% de couverture, le pourcentage de couverture est indiqué entre parenthèses en italique.

Lorsqu'un *sequence type* n'avait pu être déterminé avec certitude, le *sequence type* le plus proche était indiqué suivi d'un point d'interrogation.

Tableau 12 : Résultats du *Multilocus Sequence Typing* (MLST) pour les souches issues des patients atteints de mucoviscidose

| Souches | Allèles | | | | | | | Sequence types |
|---------|---------|------------------|--------|----------------|-------|--------|----------------|----------------|
| PH | acs_17 | aro_5 | gua_5 | mut_4 | nuo_4 | pps_4 | trp_3 | ST 111 |
| PH41 | acs_17 | aro_5 | gua_5 | mut_4 | nuo_4 | pps_4 | trp_3 | ST 111 |
| MM23 | acs_172 | aro_11 | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_4 (99,77%) | ST 235 ? |
| MM32 | acs_172 | aro_11 | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_4 | ST 235 |
| MM41 | acs_172 | aro_11 | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_4 | ST 235 |
| MM49 | acs-172 | aro_11 | gua_3 | mut_13 | nuo_1 | pps_2 | trp_4 | ST 235 |
| LL20 | acs_6 | aro_5 | gua_11 | mut_1 (99,36%) | nuo_1 | pps_12 | trp_1 (99,77%) | ST 395 ? |
| LL22 | acs_6 | aro_5 | gua_11 | mut_1 | nuo_1 | pps_12 | trp_1 | ST 395 |
| LL26 | acs_6 | aro_5 | gua_11 | mut_1 | nuo_1 | pps_12 | trp_1 | ST 395 |
| MMy5 | acs_4 | aro_214 (61,84%) | gua_16 | mut_12 | nuo_1 | pps_6 | trp_3 | ST 253 ? |
| MMy9 | acs_4 | aro_4 | gua_16 | mut_12 | nuo_1 | pps_6 | trp_3 | ST 253 |
| MMy11 | acs_4 | aro_93 (27,91%) | gua_16 | mut_12 | nuo_1 | pps_6 | trp_3 | ST 253 ? |

acs : gène de l'acétylcoenzyme-A synthétase. aro : gène de la shikimate déshydrogénase. gua : gène de la GMP synthétase. mut : enzyme MutL de réparation de l'ADN. nuo : gène de la NADH déshydrogénase I. pps : gène de la phosphoenol-pyruvate synthétase. trp : gène du composant I de l'antracilite synthétase

Lorsqu'un allèle n'avait pas été déterminé avec 100% d'homologie, le pourcentage d'homologie est indiqué entre parenthèses en gras.

Lorsqu'un allèle n'avait pas été identifié avec 100% de couverture, le pourcentage de couverture est indiqué entre parenthèses en italique.

Lorsqu'un *sequence type* n'avait pu être déterminé avec certitude, le *sequence type* le plus proche était indiqué suivi d'un point d'interrogation.

III.5.3. Construction des arbres phylogénétiques

L'arbre phylogénétique des souches issues de patients intubés ventilés en Réanimation se trouve en Figure 29.

On peut constater que les différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées d'un même patient appartiennent au même clone.

Ces clones sont la plupart du temps différents d'un patient à l'autre, excepté en ce qui concerne les patients B et E : en effet, les souches R3, R4, R10, R11 et R13 appartiennent à un même clone.

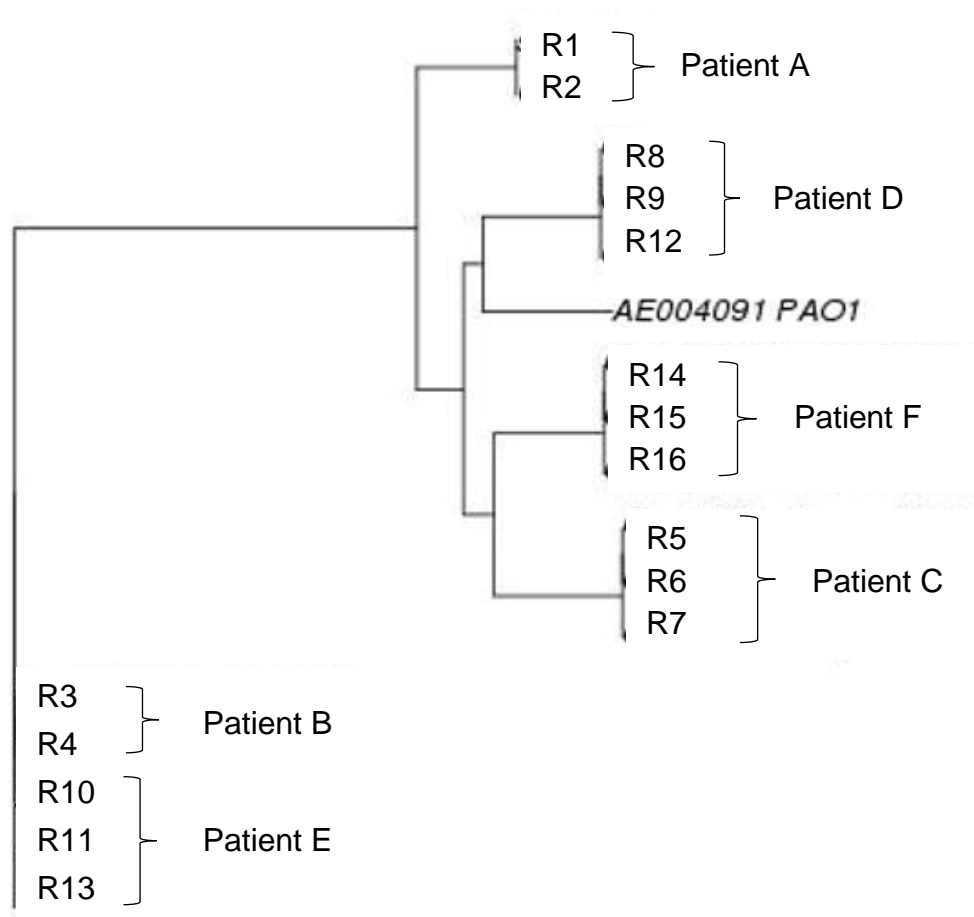


Figure 29 : arbre phylogénétique des souches issues des patients de Réanimation
PaO1 : souche de référence

L'arbre phylogénétique des souches issues de patients atteints de mucoviscidose se trouve en Figure 30.

On peut constater que les différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées d'un même patient appartiennent au même clone.

Ces clones sont tous différents d'un patient à l'autre.

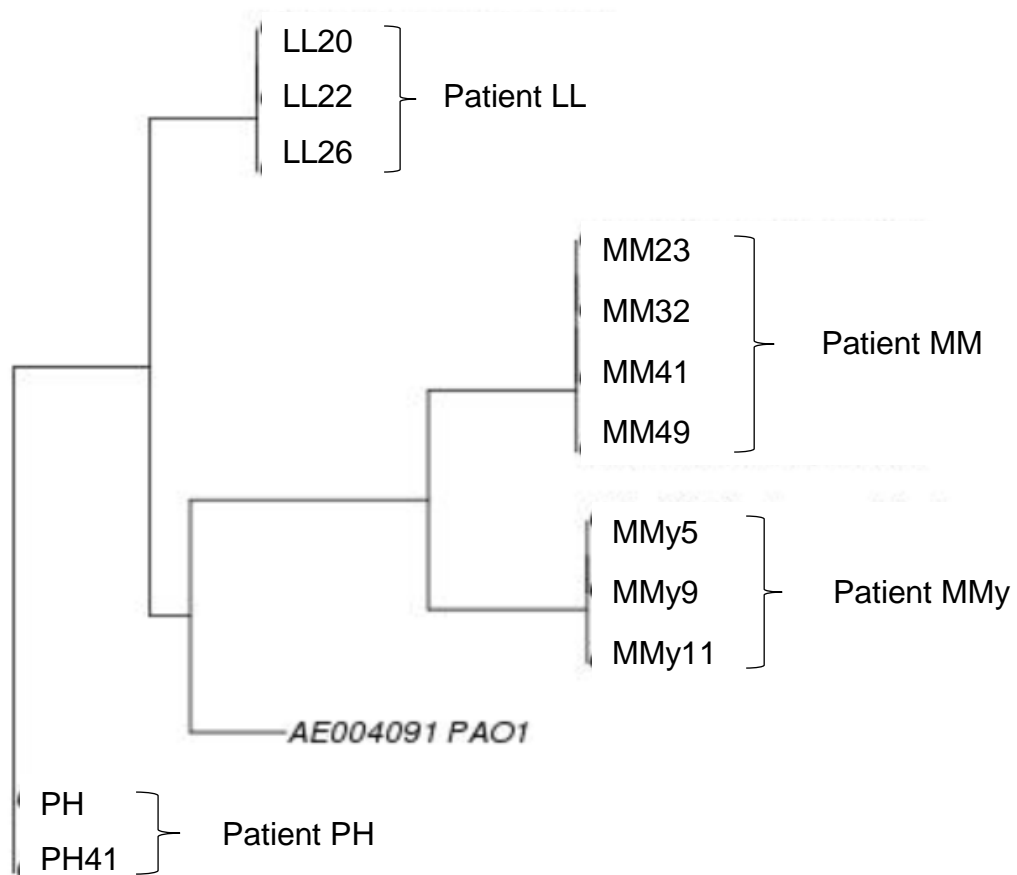


Figure 30 : arbre phylogénétique des souches issues des patients atteints de mucoviscidose
PaO1 : souche de référence

III.6. Les gènes de résistance acquis hors réseaux de cassettes d'intégrons

III.6.1. Souches issues de patients de Réanimation

Les gènes de résistance acquis de façon extrinsèque en dehors des réseaux de cassettes d'intégrons pour les souches de patients intubés ventilés en réanimation sont listés dans le Tableau 13.

Les souches R1 et R2 comportent le gène *fosA* codant une glutathion-transférase conférant une résistance à la fosfomycine, de même que les souches R3 et R4, les souches R5, R6 et R7, et les souches R8, R9 et R12.

Les souches R10, R11 et R13 ne comportent aucun gène de résistance acquis hors réseau de cassettes d'intégron.

Les souches R14, R15 et R16 comportent le gène *fosA*, ainsi que les gènes *strA* et *strB* codant une aminoside-phosphotransférase conférant une résistance à la streptomycine, mais également le gène *tetA* codant une pompe d'efflux conférant une résistance à la tétracycline et à ses dérivés.

On constate que les gènes de résistance acquis hors réseaux de cassettes d'intégrons ne varient pas chez un même patient.

Tableau 13 : Gènes de résistance acquis en dehors des réseaux de cassettes d'intégrons pour les souches issues de patients de Réanimation.

| Souches | Gènes de résistance acquis hors réseaux de cassettes | | | |
|---------|--|-------------|-------------|-------------|
| R1 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R2 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R3 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R4 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R5 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R6 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R7 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R8 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R9 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R12 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| R10 | / | / | / | / |
| R11 | / | / | / | / |
| R13 | / | / | / | / |
| R14 | <i>fosA</i> | <i>strA</i> | <i>strB</i> | <i>tetA</i> |
| R15 | <i>fosA</i> | <i>strA</i> | <i>strB</i> | <i>tetA</i> |
| R16 | <i>fosA</i> | <i>strA</i> | <i>strB</i> | <i>tetA</i> |

III.6.2. Souches issues de patients atteints de mucoviscidose

Les gènes de résistance acquis de façon extrinsèque en dehors des réseaux de cassettes d'intégrons pour les souches issues de patients atteints de mucoviscidose sont listés dans le Tableau 14.

Les souches PH et PH41 comportent le gène *fosA*. Il en va de même pour les souches MM23, MM32, MM41 et MM49.

Les souches LL20, LL22 et LL 26 comportent les gènes *fosA*, *strA*, *strB*, ainsi que le gène *tetC* codant une pompe d'efflux codant une résistance à la tétracycline et à ses dérivés.

Les souches MMy5, MMy9 et MMy11 comportent le gène *fosA*, ainsi que le gène *cmx* codant une pompe d'efflux conférant une résistance au chloramphénicol, le gène *mph(E)* codant une macrolide-phosphotransférase conférant une résistance aux macrolides, et le gène *msr(E)* codant une pompe d'efflux conférant une résistance à l'érythromycine et à la streptogramine B.

Tableau 14 : Gènes de résistance acquis en dehors des réseaux de cassettes d'intégrons pour les souches issues de patients atteints de mucoviscidose.

| Souches | Gènes de résistance acquis hors réseaux de cassettes | | | |
|---------|--|-------------|---------------|---------------|
| PH | <i>fosA</i> | / | / | / |
| PH41 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| MM23 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| MM32 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| MM41 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| MM49 | <i>fosA</i> | / | / | / |
| LL20 | <i>fosA</i> | <i>strA</i> | <i>strB</i> | <i>tetC</i> |
| LL22 | <i>fosA</i> | <i>strA</i> | <i>strB</i> | <i>tetC</i> |
| LL26 | <i>fosA</i> | <i>strA</i> | <i>strB</i> | <i>tetC</i> |
| MMy5 | <i>fosA</i> | <i>cmx</i> | <i>mph(E)</i> | <i>msr(E)</i> |
| MMy9 | <i>fosA</i> | <i>cmx</i> | <i>mph(E)</i> | <i>msr(E)</i> |
| MMy11 | <i>fosA</i> | <i>cmx</i> | <i>mph(E)</i> | <i>msr(E)</i> |

IV. Discussion

Notre étude avait pour objectif principal la recherche de réarrangements de cassettes au sein de réseaux de cassettes d'intégrons de classe 1 chez un même patient au cours du temps. Les objectifs secondaires étaient l'analyse des variants du promoteur Pc, la détermination des caractéristiques clonales des différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*, et l'étude des gènes de résistance acquis de façon extrinsèque, en dehors des réseaux de cassettes d'intégrons.

Comme exposé dans les résultats, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence des mouvements de cassettes au sein des intégrons de classe 1 chez un même patient au cours du temps. De même, nous n'avons pu démontrer aucun changement au sein des promoteurs de cassettes Pc. De tels résultats tendraient à montrer que les intégrons de classe 1 sont des structures génétiques d'une grande stabilité *in vivo*, et ce même dans un contexte de forte pression de sélection antibiotique. Pour réaliser ce travail, nous avons choisi de nous conformer autant que possible au seul article ayant décrit des réarrangements de cassettes *in vivo*¹⁰ : ainsi, nous nous sommes intéressés exclusivement à des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de prélèvements respiratoires provenant de patients dont le recrutement était hospitalier (hospitalisation complète ou hospitalisation de jour). Nous avons sélectionné d'une part des souches issues de patients hospitalisés en Réanimation Polyvalente, dans un contexte infectieux aigu, et d'autre part des souches issues de patients suivis au long cours dans le cadre d'une mucoviscidose, dans un contexte de colonisation chronique avec des épisodes d'exacerbations infectieuses. Le choix de se focaliser sur des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de prélèvements respiratoires résidait aussi dans le fait que ces souches sont conservées sur le long terme par le laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène de notre établissement. Il pourrait être pertinent d'élargir cette étude à d'autres espèces bactériennes, d'autres sites de prélèvements, d'autres profils de patients, *etc.* D'autre part, contrairement aux travaux dont nous nous sommes inspirés, notre étude ne comptait aucun patient ayant reçu une antibiothérapie par métronidazole, seul antibiotique à ce jour capable d'induire *in vivo* des mouvements de cassettes d'intégrons *via* la réponse SOS. Une approche intéressante consisterait à sélectionner uniquement des patients ayant reçu une antibiothérapie par métronidazole, ou encore un ou des antibiotique(s) connus pour déclencher *in vitro* l'activité de l'intégrase IntI1 *via* la réponse SOS. En outre, conduire une étude de façon prospective permettrait de ne pas se limiter aux collections de souches conservées mais d'investiguer également des mouvements de cassettes au sein d'espèces autres que *Pseudomonas aeruginosa*, telles que des espèces appartenant à la famille des entérobactéries. Par ailleurs, au sein des génomes de cette étude, nous n'avons rencontré que des intégrons de classe 1, ce qui n'est pas surprenant car ce sont les plus courants en pratique clinique. Effectuer un tel travail au sein des intégrons de classe 2 ne serait pas aussi rentable car leur intégrase est souvent non-fonctionnelle⁸⁵ et leur réseau de cassettes très stéréotypé⁸⁶. De même, envisager une étude comparable au sein d'intégrons de classe 3 ne serait pas pertinent au vu de leur présence exceptionnelle chez l'Homme ; c'est en effet dans les prélèvements environnementaux que la prévalence de cette classe d'intégrons est la plus élevée⁸⁷. Une autre approche, en complément de l'étude des gènes de résistance acquis par transferts horizontaux, consisterait à rechercher d'éventuelles mutations de gènes de résistance constitutifs de *Pseudomonas aeruginosa* (ou de leurs régulateurs) : *ampC*, *mexAB-OprM*, *mexXY-OprM*, *oprD* ou encore *gyrA* et *parC*. Cela permettrait possiblement d'élucider certaines modifications de phénotypes de résistance au cours du temps. Enfin, notre travail a

porté sur une partie du résistome (l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques) de *Pseudomonas aeruginosa* ; une autre réflexion pertinente serait l'étude de l'ensemble des gènes codant les supports de la virulence (le virulome) de cette espèce, afin de rechercher d'éventuels gènes ou mutations pouvant possiblement expliquer la survenue d'un tableau clinique brutal et sévère ou au contraire l'existence d'une colonisation prolongée à bas bruit.

Parmi les réseaux de cassettes que nous avons caractérisés, les cassettes mises en évidence sont toutes fréquemment rencontrées au sein des intégrons de classe 1⁷⁹. On notera que tous les intégrons de notre étude possédant un réseau de cassettes comportent au moins une cassette hébergeant un gène de résistance aux aminosides ; cela pourrait être expliqué par le fait que l'usage des aminosides est fréquent en milieu hospitalier, *a fortiori* en contexte de prise en charge réanimatoire (voie intra-veineuse), ainsi qu'en contexte de colonisation respiratoire chronique à *Pseudomonas aeruginosa* (voie inhalée).

Si certaines de ces cassettes n'ont pas de répercussion sur le phénotype de résistance de la souche qui les héberge, d'autres peuvent expliquer par leur présence une partie des résistances mises en évidence sur l'antibiogramme de la souche intéressée. Ainsi, les cassettes *aadA*, *dfr* et *cml/cat* n'ont pas de traduction phénotypique car *Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistant respectivement à la streptomycine/spectinomycine, au triméthoprim et au chloramphénicol. En revanche, la cassette *bla_{OXA-4}* détectée chez les souches R1 et R2 du patient A concorde avec la résistance des deux souches aux pénicillines y compris associées à des inhibiteurs de β -lactamases. Quant à la résistance de ces deux souches au céfépime, elle ne peut être expliquée par le contenu du réseau de l'intégron de classe 1 ; il en va de même pour le caractère intermédiaire de la souche R2 vis-à-vis de l'aztréonam, ces deux résistances étant probablement imputables à des surexpressions de pompes d'efflux. En ce qui concerne les souches R3 et R4 du patient B, la cassette *catB10* n'entraîne pas de répercussion phénotypique ; *a contrario*, la cassette *aacA4* explique probablement la résistance à la tobramycine, à la nétimycine et à la gentamicine. Il est toutefois surprenant de constater que ces deux souches sont sensibles à l'amikacine alors que le gène *aacA4* est censé apporter une résistance à cet aminoside ; le niveau d'expression conféré est probablement trop faible pour catégoriser cette souche comme résistante sur le plan de la catégorisation clinique. Les autres résistances de ces deux souches ne peuvent être expliquées par la seule présence de ce réseau *catB10-aacA4*. En particulier, l'apparition chez R4 d'une résistance aux carbapénèmes après administration d'une antibiothérapie par imipénème pourrait résulter d'une mutation du gène *oprD* qui code la porine permettant l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie. Concernant les souches R5, R6 et R7 du patient C, la présence de la cassette *aacA4* peut expliquer la résistance à tous les aminosides. La présence de la cassette *bla_{CARB-2}* peut être tenue pour responsable de la résistance à la ticarcilline ; néanmoins il n'en va pas de même pour les résistances à d'autres β -lactamines et aux fluoroquinolones. Concernant les souches R8, R9 et R12 du patient D, la présence de la cassette *aacA4* concorde avec la résistance à la gentamicine et à la tobramycine ; toutefois, comme pour R3 et R4, il a été constaté pour ces trois souches une sensibilité à l'amikacine malgré la présence d'une telle cassette. En ce qui concerne les souches R10, R11 et R13 du patient E, la cassette *aadB* concorde tout à fait avec le phénotype de résistance aux aminosides épargnant l'amikacine. Les résistances aux pénicillines seules et en association, aux céphalosporines, aux quinolones et le caractère intermédiaire à l'aztréonam, puisque non

attribuables aux cassettes d'intégrons ou à d'autres gènes acquis de façon extrinsèque, pourraient résulter de mutations de gènes constitutifs ou de leurs régulateurs. L'apparition chez R13 d'une résistance aux carbapénèmes à la suite d'une antibiothérapie par imipénème pourrait être consécutive à une mutation du gène *oprD*. Concernant les souches R14, R15 et R16 du patient F, les cassettes *aacA56* et *aadB* peuvent être reliées au phénotype de résistance à la totalité des aminosides. Concernant les souches PH et PH41 du patient PH, la détection de la cassette *aacA4* concorde avec la résistance à tous les aminosides testés ; de plus la cassette *bla_{OXA-9}* peut être rattachée à la résistance de ces souches aux pénicillines, y compris associées à des inhibiteurs de β -lactamases. En revanche, ces cassettes ne peuvent être mises en cause dans la résistance de ces souches aux quinolones ni dans le caractère intermédiaire à l'imipénème. Concernant les souches MM23, MM32, MM41 et MM49 du patient MM, la cassette *aacA4* peut expliquer la résistance à tous les aminosides testés. En ce qui concerne les souches LL20, LL22 et L26 du patient LL, il est impossible d'apprécier l'impact de la cassette *qacH* par un antibiogramme, car les ammoniums quaternaires ne sont pas des antibiotiques mais des composants présents dans les désinfectants. La présence de la cassette *aadB* concorde tout à fait avec le phénotype de résistance aux aminosides de LL20 et LL26 ; cependant il est surprenant de constater que la souche LL22 est résistante à l'amikacine en plus des autres aminosides. Concernant les souches MMy5, MMy9 et MMy11 du patient MMy, la cassette *aacA4* peut être logiquement rattachée à la résistance à tous les aminosides testés. L'apparition chez MMy11 d'une résistance aux quinolones après une antibiothérapie par ciprofloxacine pourrait quant à elle provenir d'une mutation des gènes *gyrA* et *parC*.

D'autre part, il est intéressant de souligner que certains réseaux de cassettes rencontrés dans notre étude constituent des assemblages inédits. En effet, les réseaux suivants n'ont jamais été répertoriés tels quels dans la Genbank[®] :

aacA4-cmIB-bla_{OXA-9} (intégron 2) des souches PH et PH41),

aadA2-bla_{OXA-4}-cmIA1 (intégron des souches R1 et R2),

aacA4-bla_{CARB-2}-aadA2 (intégron des souches R5, R6 et R7),

dfrB5-aadB-ISP62 (intégron 2) des souches R14, R15 et R16).

Ce dernier réseau possède une particularité notable par rapport aux autres réseaux mis en évidence dans notre étude : l'interruption du site *attC* d'une cassette *aadB* par une séquence d'insertion ISP62. Les IS (*insertion sequences*) sont des éléments génétiques capables de se transposer de façon autonome d'un endroit du génome à un autre grâce à une enzyme appelée transposase⁸⁸. ISP62 a été fréquemment répertoriée au sein de génomes de souches de *Pseudomonas aeruginosa*. L'association d'une IS et d'un intégron est loin d'être exceptionnelle⁸⁹ ; néanmoins l'interruption du site *attC* par une IS est moins classique. En ce qui concerne le réseau caractérisé dans notre travail, l'explication réside dans le fait qu'ISP62 appartient à la famille des IS110 et au sous-groupe des IS1111, qui possède une forte affinité pour les structures secondaires en tige-boucle⁹⁰, or les sites *attC* constituent un exemple de structure en tige-boucle.

Tous les autres réseaux de cassettes avaient déjà été répertoriés, et ce au sein de diverses espèces bactériennes dont *Pseudomonas aeruginosa*. Le réseau *aadB-gcuE6-aadA11* porté par l'intégron des souches R10, R11 et R13 comporte une cassette dont l'orf se termine dans la cassette suivante et code une protéine de fonction inconnue. Cette catégorie de cassettes, appelées *gcu* (*gene cassettes of unknown function*), est généralement plus courte (300 à 400 pb) que les cassettes hébergeant des gènes de résistance aux antibiotiques. On recense à ce jour plus de 60 *gcu* ⁷⁹. Par ailleurs, nous avons mis en évidence deux intégrons de classe 1 plus « atypiques », qui ne comportaient pas de réseau de cassette, tous deux portés par les souches R8, R9 et R12. Le premier est un intégron dont la région 5'CS est interrompue au niveau du site *attI1* par une région 3'CS elle-même tronquée car ne comportant que le gène *sul1*. Un tel intégron a été répertorié à plusieurs reprises au sein de génomes de diverses espèces bactériennes dont *Pseudomonas aeruginosa* et des bactéries à Gram positif ; il est très probablement dans l'incapacité d'intégrer des cassettes, ne possédant pas de site *attI1* fonctionnel ⁹¹. Pour notre étude, nous avons pu étudier la séquence nucléotidique en aval de cet intégron ; il s'avère que celle-ci est constituée d'une séquence d'insertion IS6100. Une association semblable a été constatée à deux reprises sur le chromosome de souches de *Pseudomonas aeruginosa* (*accession numbers* : CP029090 et KY860573). Le deuxième intégron « atypique » est un intégron vide, comportant une région 5'CS entière et donc très probablement fonctionnelle, directement suivie d'une région 3'CS entière. Un tel intégron a été répertorié à plusieurs reprises au sein de génomes de souches de *Pseudomonas aeruginosa* ; la fonction de ce type d'intégrons n'est pas encore clairement établie, ils joueraient probablement un rôle de « réservoir » ⁹², prêts par exemple à intégrer rapidement des cassettes de résistance lors du déclenchement de la réponse SOS par l'introduction d'un antibiotique dans l'environnement.

L'analyse des différents variants du promoteur Pc montre une importante diversité de ceux-ci au sein des intégrons de notre étude. Seul le Pch2 n'a pas été mis en évidence, mais il s'agit du variant le moins fréquemment rencontré ⁹³. Il ne semble pas exister, pour les intégrons retrouvés dans notre étude, de corrélation entre la longueur du réseau et la force relative du variant de Pc.

L'étude des gènes de résistance acquis de façon extrinsèque hors réseaux de cassettes d'intégrons a révélé une diversité intéressante. On note toutefois une forte prévalence du gène *fosA* (25 souches sur 28), qui, du reste, ne va pas toujours de pair avec un phénotype clinique de résistance à la fosfomycine (cf. patient A, patient LL, patient MMy). Il est surprenant de constater la présence des gènes *cmx*, *tet*, *strA/strB*, et *msrI/mph* conférant des résistances respectives au chloramphénicol, aux cyclines, à la streptomycine et aux macrolides, qui sont des résistances déjà présentes naturellement chez *Pseudomonas aeruginosa*, et plus généralement retrouvées chez des bactéries à Gram positif. A noter que notre travail retrouvait dans l'ensemble une grande stabilité de ces gènes chez un même patient au cours du temps.

L'étude des caractéristiques clonales des différentes souches a montré qu'il n'existe qu'un seul clone bactérien pour chaque patient. La détermination du sérotype était insuffisante pour explorer une clonalité, certaines souches non clonales ayant des sérotypes identiques (souches des patients D et F de même sérotype O4). La technique MLST a permis

d'approfondir davantage les explorations, toutefois un nombre important des données générées par cette méthode manquait de fiabilité, notamment en ce qui concerne la détermination des allèles du gène de la shikimate déshydrogénase (*aro*) et du gène du composant I de l'antracilite synthétase (*trp*), avec des insuffisances d'homologie ou de couverture. En effet, la détermination du MLST, habituellement réalisée par un séquençage Sanger, implique un séquençage parfait des 7 gènes de ménage, ce qui ne peut être assuré avec la même qualité par un séquençage type NGS où des erreurs de séquençage, liées notamment aux homopolymères, peuvent survenir. Le *Gold Standard* pour déterminer la clonalité des différentes souches fut donc la construction d'arbres phylogénétiques, qui présente l'avantage d'intégrer dans la comparaison des souches l'intégralité des génomes, contrairement au MLST. Concernant les souches issues de patients atteints de mucoviscidose, on observait un seul clone bactérien par patient ; et il s'agissait de clones différents entre les patients. Concernant les souches de patients hospitalisés en Réanimation, on observait un seul clone bactérien par patient ; cependant deux patients étaient porteurs d'un même clone : le patient B et le patient E. Après analyse des dossiers médicaux et des séjours de ces patients, il est apparu qu'ils avaient été hospitalisés dans deux box très proches au sein du service de Réanimation Polyvalente à environ 6 mois d'intervalle. Par conséquent, il aurait semblé pertinent de recouper nos résultats d'analyses avec ceux obtenus lors de prélèvements environnementaux réalisés au niveau des surfaces et des points d'eau de ce box, afin d'établir l'existence éventuelle d'un clone de *Pseudomonas aeruginosa* présent au long cours dans ces locaux, et de tenter d'en déterminer l'origine exacte pour l'éradiquer. Nous avons contacté pour ce faire nos collègues Hygiénistes ; il s'avère que les souches issues de prélèvements de surfaces et de points d'eau ne sont pas conservées à titre systématique. Néanmoins, il serait légitime d'effectuer de nouveau de tels prélèvements ; en cas de mise en évidence d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, la détermination de ses caractéristiques clonales et leur comparaison à celles du clone retrouvé dans notre travail serait opportune. On peut également imaginer que nous soyons en présence d'un clone de *Pseudomonas aeruginosa* diffusant à l'échelle régionale voire nationale ; dans ce cas, le fait de retrouver ce clone chez deux patients d'un même service serait tout simplement fortuit. Le fait que les souches de ces 2 patients hébergent 2 intégrons différents constitue un argument en faveur de cette dernière hypothèse, allant à l'encontre d'une simple transmission par un réservoir commun.

Notre étude présente des limites. Ainsi, le nombre de souches bactériennes et de patients analysés était peu important (28 souches, 10 patients), de même que la durée de suivi (12 jours au minimum, 27 mois au maximum). Il serait légitime d'envisager une étude comparable à plus grande échelle, tant au plan des effectifs qu'au plan de la chronologie. D'autre part, les données de notre étude ont été recueillies de façon rétrospective ; or une étude prospective permettrait sans doute d'augmenter la fiabilité du recueil des données.

Il existe en outre des limites techniques et bioinformatiques propres au séquençage haut débit. Le génome de *Pseudomonas aeruginosa* étant plus volumineux que celui d'autres espèces bactériennes, on ne peut exclure l'éventualité que certains des génomes de notre étude n'aient pas été séquencés en totalité. Au vu des travaux de séquençage de génomes par NGS réalisés antérieurement au laboratoire, nous avons estimé pouvoir grouper sur une même puce au maximum une quinzaine de génomes de 6 à 7 Mb. Nous avons donc utilisé deux puces pour nos 28 souches. Les scores de profondeur que nous avons obtenus témoignent d'une qualité de séquençage correcte ; cependant, dans l'idéal, ces scores auraient pu être

encore augmentés en utilisant 3 voire 4 puces. Cela aurait bien entendu engendré des coûts plus importants, c'est pourquoi nous n'avons volontairement pas choisi cette solution. Par ailleurs, le logiciel MIRA permettant l'assemblage des *reads* en *contigs*, bien qu'utilisant des algorithmes complexes, peut générer des erreurs lors de l'assemblage qui sont difficiles à détecter et à corriger par la suite. Nous avons choisi de faire appel au séquençage complet des génomes de *Pseudomonas aeruginosa* plutôt qu'à un séquençage sélectif de certaines régions du génome (réseaux de cassette, régions 5'CS, gènes requis pour le MLST, ...) car, bien que plus coûteux, le NGS permet un gain de temps considérable et un accès plus approfondi au patrimoine génétique des souches bactériennes. De plus, malgré la quantité très importante de données générées, il existe des logiciels ainsi que de nombreuses plateformes en ligne permettant de trier efficacement ces données pour répondre à des questions précises.

Conclusion

Ce travail n'a pas permis de mettre en évidence de mouvements de cassettes d'intégrons chez un même patient au cours du temps.

Néanmoins, nous avons pu valider un modèle d'étude pertinent pour servir un tel objectif, tant au plan technique qu'au plan bioinformatique. Il serait souhaitable de mener une étude comparable à plus grande échelle, de façon prospective, portant sur une plus grande diversité d'espèces bactériennes et de natures de prélèvements.

De plus, nous avons caractérisé quatre réseaux de cassettes inédits au sein des intégrons de classe 1 ; ces informations constituent une contribution intéressante aux données épidémiologiques de cette classe d'intégrons.

Nous avons également découvert un clone de *Pseudomonas aeruginosa* qui pourrait provenir d'un réservoir au sein de notre établissement hospitalier, ou même diffuser à plus grande échelle, et qui ouvre la voie à un travail collaboratif avec l'unité fonctionnelle d'Hygiène hospitalière.

Dans le contexte actuel d'augmentation de la dissémination de l'antibiorésistance, il paraît crucial de recueillir autant de données que possible permettant de mettre en place des stratégies de lutte afin de prévenir, ou du moins minimiser l'impact de cette menace majeure sur la santé publique.

Références bibliographiques

1. Verstraeten, N., Knapen, W., Fauvart, M. & Michiels, J. A Historical Perspective on Bacterial Persistence. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1333**, 3–13 (2016).
2. Antimicrobial resistance. *World Health Organization* Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. (Accessed: 25th June 2018)
3. Chandy, S. J. *et al.* The impact of policy guidelines on hospital antibiotic use over a decade: a segmented time series analysis. *PloS One* **9**, e92206 (2014).
4. Azuma, T. *et al.* Performance and efficiency of removal of pharmaceutical compounds from hospital wastewater by lab-scale biological treatment system. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **25**, 14647–14655 (2018).
5. Stokes, H. W. & Hall, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* **3**, 1669–1683 (1989).
6. Escudero, J. A., Loot, C., Nivina, A. & Mazel, D. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3–0019–2014 (2015).
7. Barraud, O. & Ploy, M.-C. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *J. Bacteriol.* **197**, 2171–2178 (2015).
8. Engelstädter, J., Harms, K. & Johnsen, P. J. The evolutionary dynamics of integrons in changing environments. *ISME J.* **10**, 1296–1307 (2016).
9. Loot, C. *et al.* Differences in Integron Cassette Excision Dynamics Shape a Trade-Off between Evolvability and Genetic Capacitance. *mBio* **8**, (2017).
10. Hocquet, D. *et al.* Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* **8**, e1002778 (2012).
11. Thonard, J. C. & Scherp, H. W. INHIBITION OF A COLLAGENASE BY THE HUMAN GINGIVAL MICROBIOTA1. *J. Bacteriol.* **76**, 355–358 (1958).

12. Beck, J. M., Young, V. B. & Huffnagle, G. B. The microbiome of the lung. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **160**, 258–266 (2012).
13. O'Dwyer, D. N., Dickson, R. P. & Moore, B. B. The Lung Microbiome, Immunity, and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 4839–4847 (2016).
14. Peterson, J. *et al.* The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009).
15. Lif Holgerson, P., Harnevik, L., Hernell, O., Tanner, A. C. R. & Johansson, I. Mode of Birth Delivery Affects Oral Microbiota in Infants. *J. Dent. Res.* **90**, 1183–1188 (2011).
16. Segal, L. N., Rom, W. N. & Weiden, M. D. Lung Microbiome for Clinicians. New Discoveries about Bugs in Healthy and Diseased Lungs. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **11**, 108–116 (2014).
17. Wu, B. G. & Segal, L. N. Lung Microbiota and Its Impact on the Mucosal Immune Phenotype. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017).
18. Muhlebach, M. S. *et al.* Initial acquisition and succession of the cystic fibrosis lung microbiome is associated with disease progression in infants and preschool children. *PLoS Pathog.* **14**, e1006798 (2018).
19. Pragman, A. A. *et al.* The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiome* **6**, 7 (2018).
20. Chung, K. F. Potential Role of the Lung Microbiome in Shaping Asthma Phenotypes. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **14**, S326–S331 (2017).
21. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R. & Huffnagle, G. B. Towards an Ecology of the Lung: New Conceptual Models of Pulmonary Microbiology and Pneumonia Pathogenesis. *Lancet Respir. Med.* **2**, 238–246 (2014).

22. Bonadia, L. C. *et al.* CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene* **540**, 183–190 (2014).
23. Chin, M., Aaron, S. D. & Bell, S. C. The treatment of the pulmonary and extrapulmonary manifestations of cystic fibrosis. *Presse Medicale Paris Fr. 1983* **46**, e139–e164 (2017).
24. Li, D., Wang, B., Wang, H. & Liu, Q. Prognostic significance of pulmonary hypertension in patients with cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **97**, e9708 (2018).
25. Coburn, B. *et al.* Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci. Rep.* **5**, 10241 (2015).
26. Burgel, P.-R. [Epidemiological trends of cystic fibrosis in France: 10-year perspective]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* **23**, 12S4–12S8 (2016).
27. Available at:
http://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/registre_francais_de_la_mucoviscidose_-_bilan_des_donnees_2016.pdf. (Accessed: 14th July 2018)
28. Lynch, J. P., Sayah, D. M., Belperio, J. A. & Weigt, S. S. Lung Transplantation for Cystic Fibrosis: Results, Indications, Complications, and Controversies. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **36**, 299–320 (2015).
29. Ricard, J.-D., Dreyfuss, D. & Saumon, G. Ventilator-induced lung injury. *Curr. Opin. Crit. Care* **8**, 12–20 (2002).
30. Puyo, C. A. *et al.* Endotracheal tube-induced sore throat pain and inflammation is coupled to the release of mitochondrial DNA. *Mol. Pain* **13**, 1744806917731696 (2017).
31. Cardeñosa Cendrero, J. A. *et al.* Role of different routes of tracheal colonization in the development of pneumonia in patients receiving mechanical ventilation. *Chest* **116**, 462–470 (1999).

32. Sands, K. M. *et al.* Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *J. Crit. Care* **37**, 30–37 (2017).
33. Rouzé, A., Jaillette, E., Poissy, J., Préau, S. & Nseir, S. Tracheal Tube Design and Ventilator-Associated Pneumonia. *Respir. Care* **62**, 1316–1323 (2017).
34. Kula, R., Sklienka, P., Chýlek, V., Szturz, P. & Neiser, J. [Current view on the risks of artificial pulmonary ventilation]. *Vnitr. Lek.* **53**, 1319–1324 (2007).
35. Torres, A. *et al.* International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *Eur. Respir. J.* **50**, (2017).
36. Timsit, J.-F., Esaied, W., Neuville, M., Bouadma, L. & Mourvillier, B. Update on ventilator-associated pneumonia. *F1000Research* **6**, (2017).
37. Charles, M. P. *et al.* Aetiological agents of ventilator-associated pneumonia and its resistance pattern - a threat for treatment. *Australas. Med. J.* **6**, 430–434 (2013).
38. Chastre, J. & Fagon, J.-Y. Ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 867–903 (2002).
39. Park, D. R. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. *Respir. Care* **50**, 742–763; discussion 763–765 (2005).
40. Melsen, W. G. *et al.* Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 665–671 (2013).

41. Moore, J. E., Heaney, N., Millar, B. C., Crowe, M. & Elborn, J. S. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun. Dis. Public Health* **5**, 23–26 (2002).
42. Devarajan, N. *et al.* Antibiotic resistant *Pseudomonas spp.* in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions. *Water Res.* **115**, 256–265 (2017).
43. Alhede, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M. & Alhede, M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv. Appl. Microbiol.* **86**, 1–40 (2014).
44. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings | HAI | CDC. (2018). Available at: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>. (Accessed: 1st July 2018)
45. Vincent, J. L. *et al.* The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* **274**, 639–644 (1995).
46. Article - Bulletin épidémiologique hebdomadaire. Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2014/29/2014_29_1.html. (Accessed: 1st July 2018)
47. Callejas-Díaz, A. *et al.* Impact of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in a tertiary hospital: Mortality and prognostic factors. *Med. Clin. (Barc.)* (2018). doi:10.1016/j.medcli.2018.04.020
48. Paling, F. P. *et al.* Rationale and design of ASPIRE-ICU: a prospective cohort study on the incidence and predictors of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the ICU. *BMC Infect. Dis.* **17**, (2017).
49. Turković, T. M. *et al.* MICROBIAL PROFILE AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF PATHOGENS CAUSING VENTILATOR- ASSOCIATED PNEUMONIA AT INTENSIVE CARE UNIT, SESTRE MILOSRDNICE UNIVERSITY HOSPITAL CENTER, ZAGREB, CROATIA. *Acta Clin. Croat.* **54**, 127–135 (2015).

50. Kostadinovska-Jordanoska, B., Sosolceva, M., Stojanovska, S., Licenovska, M. & Vasileva, O. Ventilator-associated pneumonia in an ICU: epidemiology, etiology and comparison of two bronchoscopic methods for microbiological specimen sampling., Ventilator-associated pneumonia in an ICU: epidemiology, etiology and comparison of two bronchoscopic methods for microbiological specimen sampling. *Crit. Care Lond. Engl. Crit. Care* **12**, **12**, P50, P50–P50 (2008).
51. Jelsbak, L. *et al.* Molecular Epidemiology and Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* Populations in Lungs of Cystic Fibrosis Patients. *Infect. Immun.* **75**, 2214–2224 (2007).
52. Colomb-Cotinat, M. *et al.* Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **5**, (2016).
53. Adam, E. C., Mitchell, B. S., Schumacher, D. U., Grant, G. & Schumacher, U. *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 2102–2104 (1997).
54. Gordon, G. M., Moradshahi, N., Jeong, S., Lane, C. & Fini, M. E. A novel mechanism of increased infections in contact lens wearers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 9188–9194 (2011).
55. Galloway, D. R. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol. Microbiol.* **5**, 2315–2321 (1991).
56. Heck, L. W. *et al.* Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **144**, 2253–2257 (1990).
57. Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.* **36**, 78–91 (2006).
58. Wick, M. J., Frank, D. W., Storey, D. G. & Iglewski, B. H. Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 335–363 (1990).

59. Stonehouse, M. J. *et al.* A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol. Microbiol.* **46**, 661–676 (2002).
60. Beare, P. A., For, R. J., Martin, L. W. & Lamont, I. L. Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol. Microbiol.* **47**, 195–207 (2003).
61. Flemming, H. C. & Wingender, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* **43**, 1–8 (2001).
62. Gilbert, P., Collier, P. J. & Brown, M. R. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1865–1868 (1990).
63. Li, X. Z., Nikaido, H. & Poole, K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1948–1953 (1995).
64. Masuda, N. *et al.* Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2242–2246 (2000).
65. Baquero, F. The 2010 Garrod Lecture: the dimensions of evolution in antibiotic resistance: ex unibus plurum et ex pluribus unum. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1659–1672 (2011).
66. Cabot, G. *et al.* Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1906–1911 (2011).
67. Pan, Y.-P., Xu, Y.-H., Wang, Z.-X., Fang, Y.-P. & Shen, J.-L. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* **198**, 565–571 (2016).

68. Muller, C., Plésiat, P. & Jeannot, K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1211–1221 (2011).
69. Nordmann, P. [Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems]. *Med. Sci. MS* **26**, 950–959 (2010).
70. Jeannot, K., Bolard, A. & Plésiat, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 526–535 (2017).
71. Cluzet, V. C. *et al.* Risk factors for *gyrA* and *parC* mutations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **36**, 387–393 (2015).
72. Available at: http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/actualite/Rapport_CNR_2016.pdf. (Accessed: 15th July 2018)
73. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *World Health Organization* Available at: <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. (Accessed: 10th June 2018)
74. Nesvera, J., Hochmannová, J. & Pátek, M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 391–395 (1998).
75. Poonsuk, K., Tribuddharat, C. & Chuanchuen, R. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical isolates. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **43**, 376–384 (2012).
76. Subedi, D., Vijay, A. K. & Willcox, M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin. Exp. Optom.* **101**, 162–171 (2018).
77. Collis, C. M. & Hall, R. M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 155–162 (1995).

78. Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D. & Ploy, M.-C. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet.* **6**, e1000793 (2010).
79. Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E. & Iredell, J. R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 757–784 (2009).
80. Guérin, E., Cambray, G., Da Re, S., Mazel, D. & Ploy, M.-C. [The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons]. *Med. Sci. MS* **26**, 28–30 (2010).
81. Baharoglu, Z. & Mazel, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 1126–1145 (2014).
82. Barraud, O., Baclet, M. C., Denis, F. & Ploy, M. C. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1642–1645 (2010).
83. EUCAST: Clinical breakpoints. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. (Accessed: 20th July 2018)
84. Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. & Dowson, C. G. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5644–5649 (2004).
85. Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A. & Roy, P. H. IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* **184**, 1712–1721 (2002).
86. Xia, R., Ren, Y., Guo, X. & Xu, H. Molecular diversity of class 2 integrons in antibiotic-resistant gram-negative bacteria found in wastewater environments in China. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* **22**, 402–414 (2013).
87. Simo Tchuinte, P. L. *et al.* Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *Int. J. Antimicrob. Agents* **48**, 431–434 (2016).

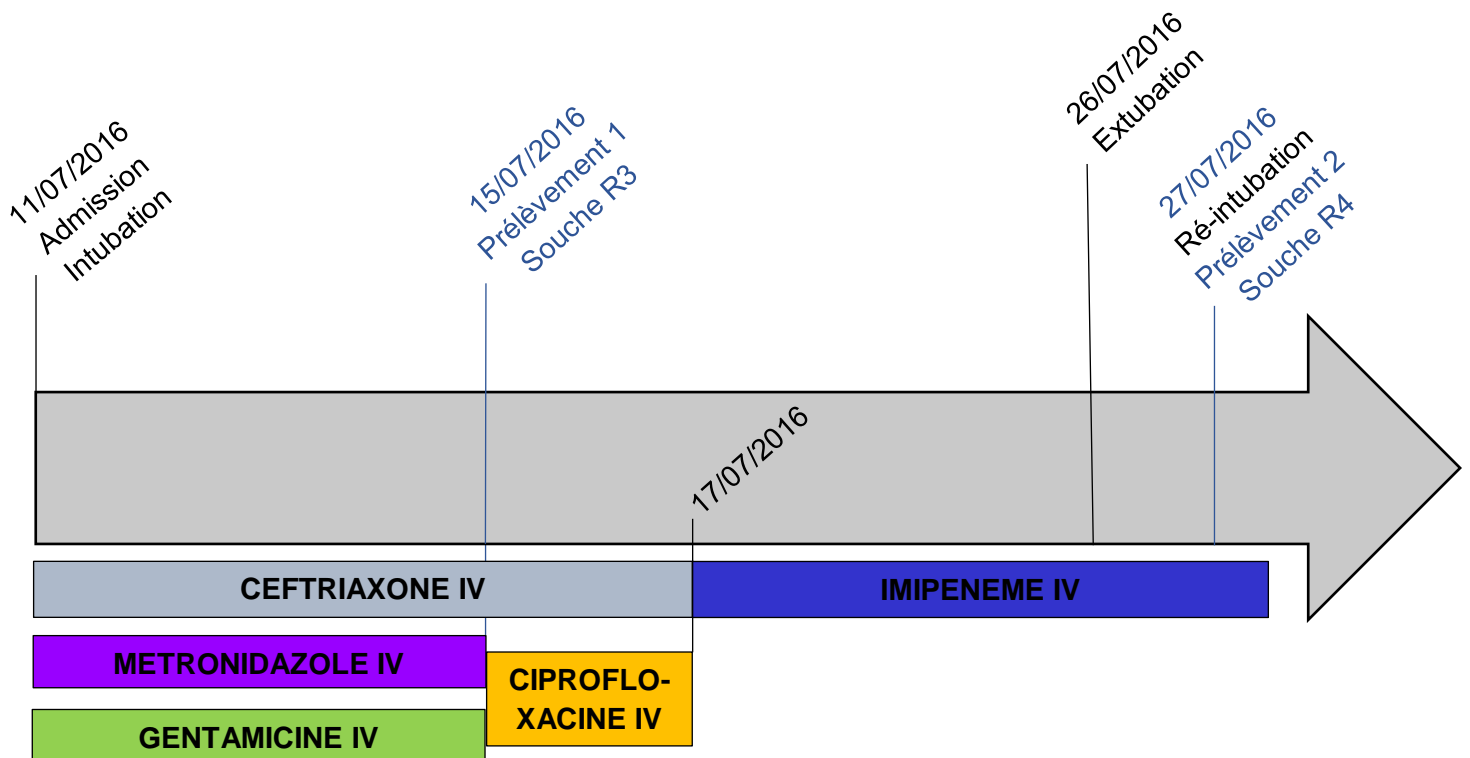
88. Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B. & Chandler, M. Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0030-2014 (2015).
89. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, (2018).
90. Post, V. & Hall, R. M. Insertion sequences in the IS1111 family that target the *attC* recombination sites of integron-associated gene cassettes. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**, 182–187 (2009).
91. Barraud, O. *et al.* Sulphonamide resistance associated with integron derivative Tn6326 in *Actinotignum schaalii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2670–2671 (2016).
92. Ruiz-Martínez, L. *et al.* Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38**, 398–402 (2011).
93. Papagiannitsis, C. C., Tzouvelekis, L. S. & 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.* **53**, 277–280 (2009).

Annexes

| | |
|---|----|
| Annexe 1. Contexte clinique et antibiothérapies du patient B | 87 |
| Annexe 2. Contexte clinique et antibiothérapies du patient C | 88 |
| Annexe 3. Contexte clinique et antibiothérapies du patient D | 89 |
| Annexe 4. Contexte clinique et antibiothérapies du patient E | 90 |
| Annexe 5. Contexte clinique et antibiothérapies du patient F | 91 |
| Annexe 6. Contexte clinique et antibiothérapies du patient LL | 92 |
| Annexe 7. Contexte clinique et antibiothérapies du patient MM | 93 |
| Annexe 8. Contexte clinique et antibiothérapies du patient MMy..... | 94 |

Annexe 1. Contexte clinique et antibiothérapies du patient B

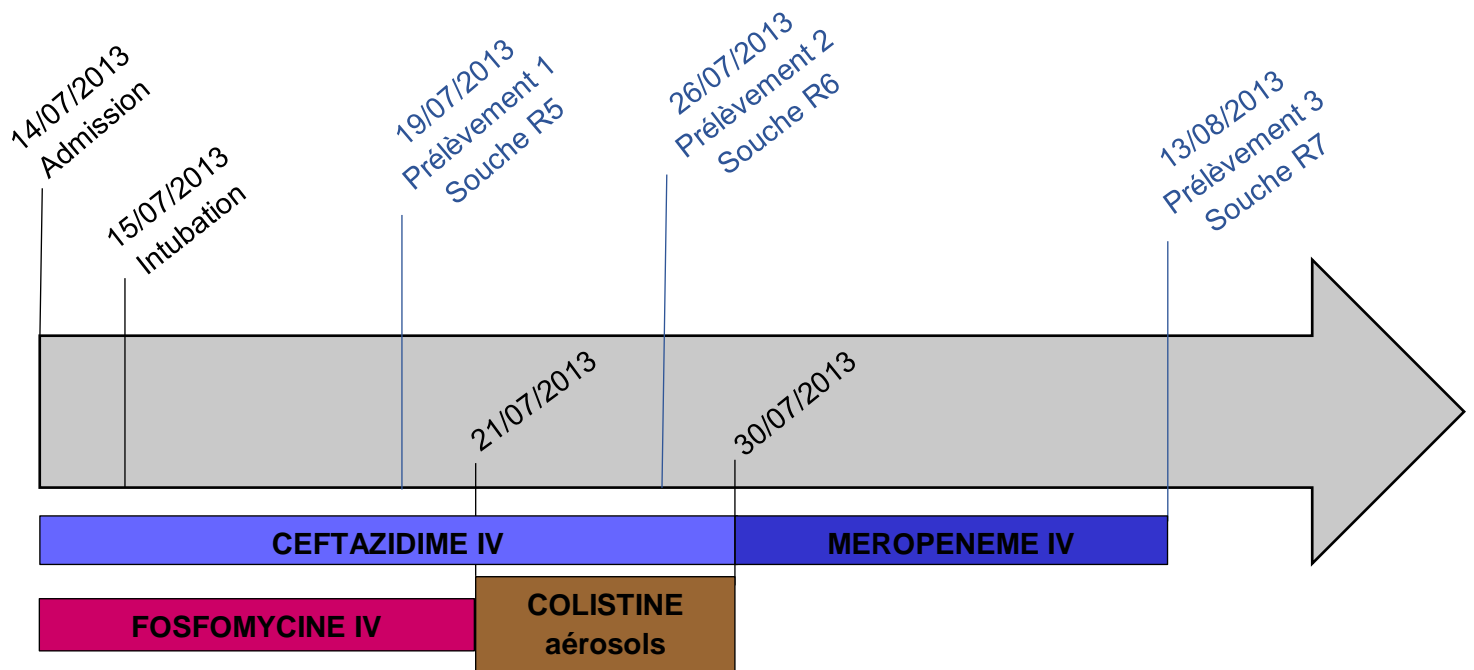
- Homme de 72 ans
- Hospitalisé en réanimation Polyvalente pour choc septique en post-opératoire immédiat d'un lavage de péritonite purulente sans lésion étiologique retrouvée.
- Antécédents : ° Bronchopneumopathie obstructive chronique post-tabagique
 - ° Hypertension artérielle
 - ° Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
 - ° Arythmie complète par fibrillation auriculaire



Annexe 2. Contexte clinique et antibiothérapies du patient C

- Homme de 31 ans
- Hospitalisé en Réanimation Polyvalente pour arrêt cardio-respiratoire en contexte de neutropénie fébrile

- Antécédents : ° Retard mental séquellaire d'une rougeole avec méningo-encéphalite dans l'enfance
 - ° Greffe rénale sur glomérulonéphrite endocapillaire séquellaire d'une rougeole dans l'enfance
 - ° Lymphome B diffus à grandes cellules en cours de chimiothérapie (dernière cure 12 jours avant admission)
 - ° Colonisation respiratoire chronique connue à *Pseudomonas aeruginosa*



Annexe 3. Contexte clinique et antibiothérapies du patient D

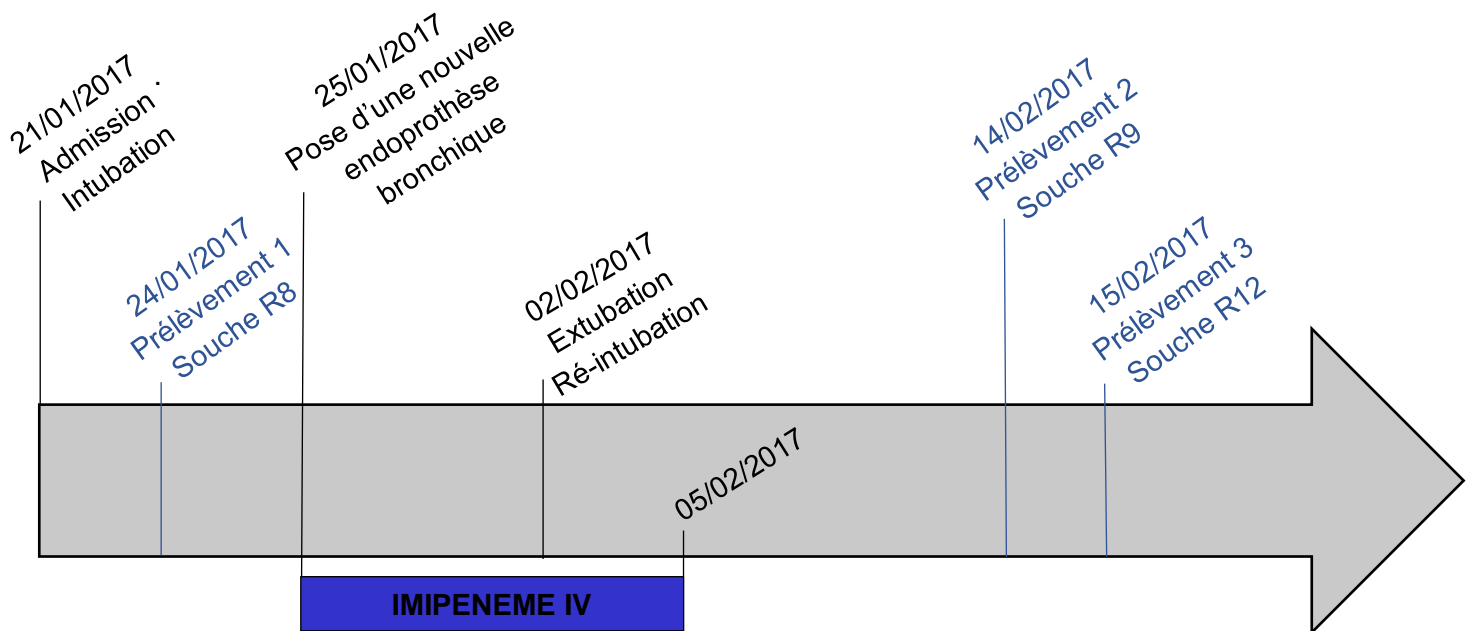
- Femme de 51 ans

- Hospitalisée en réanimation polyvalente pour insuffisance respiratoire aiguë dans les suites immédiates d'une ablation d'endoprothèse bronchique gauche

- Antécédents : ° Pneumonectomie droite à la suite d'une atrophie pulmonaire sur agénésie de l'artère pulmonaire droite

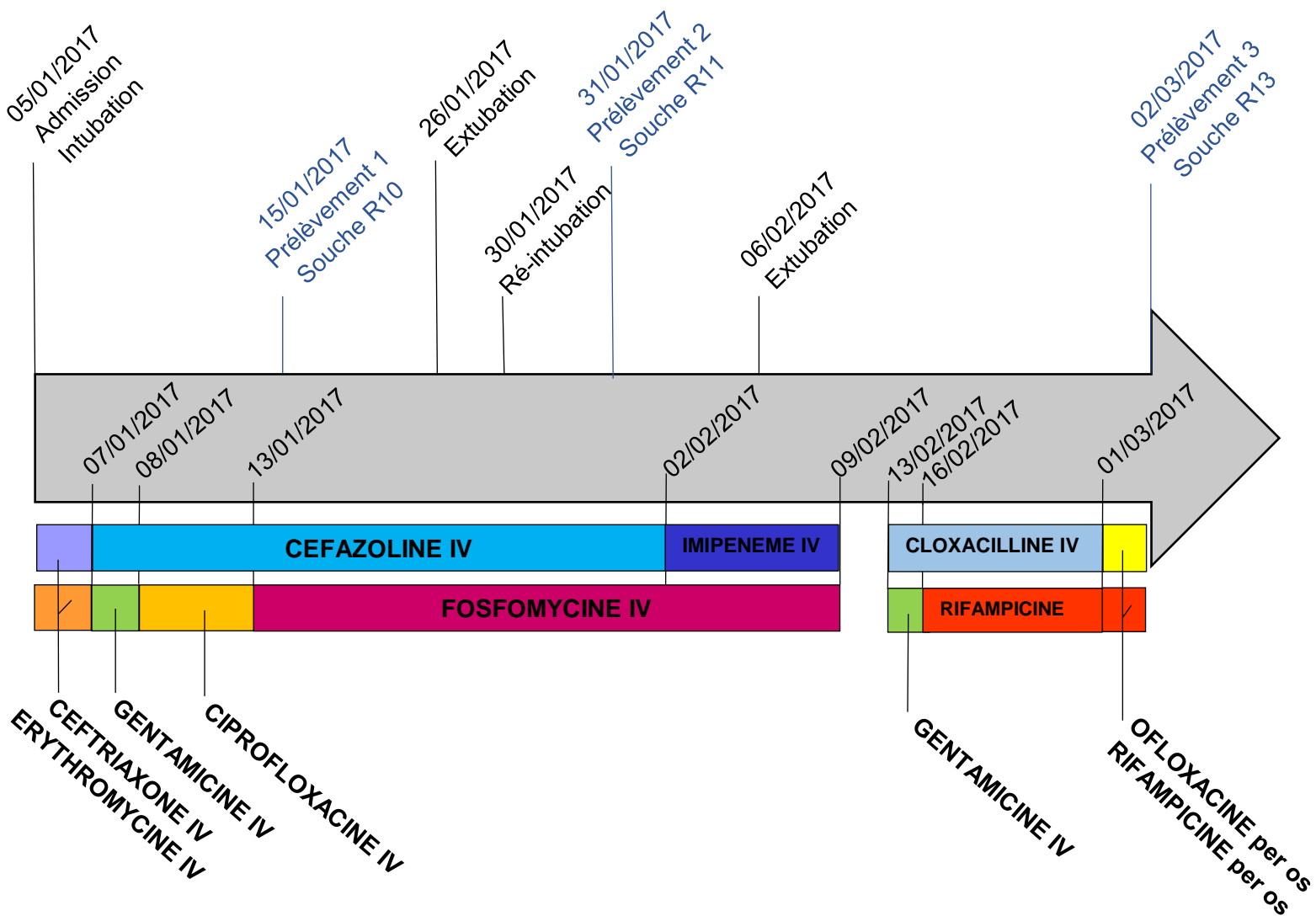
° Trachéo-bronchomalacie sur syndrome post-pneumonectomie

° Pose d'endoprothèse bronchique gauche



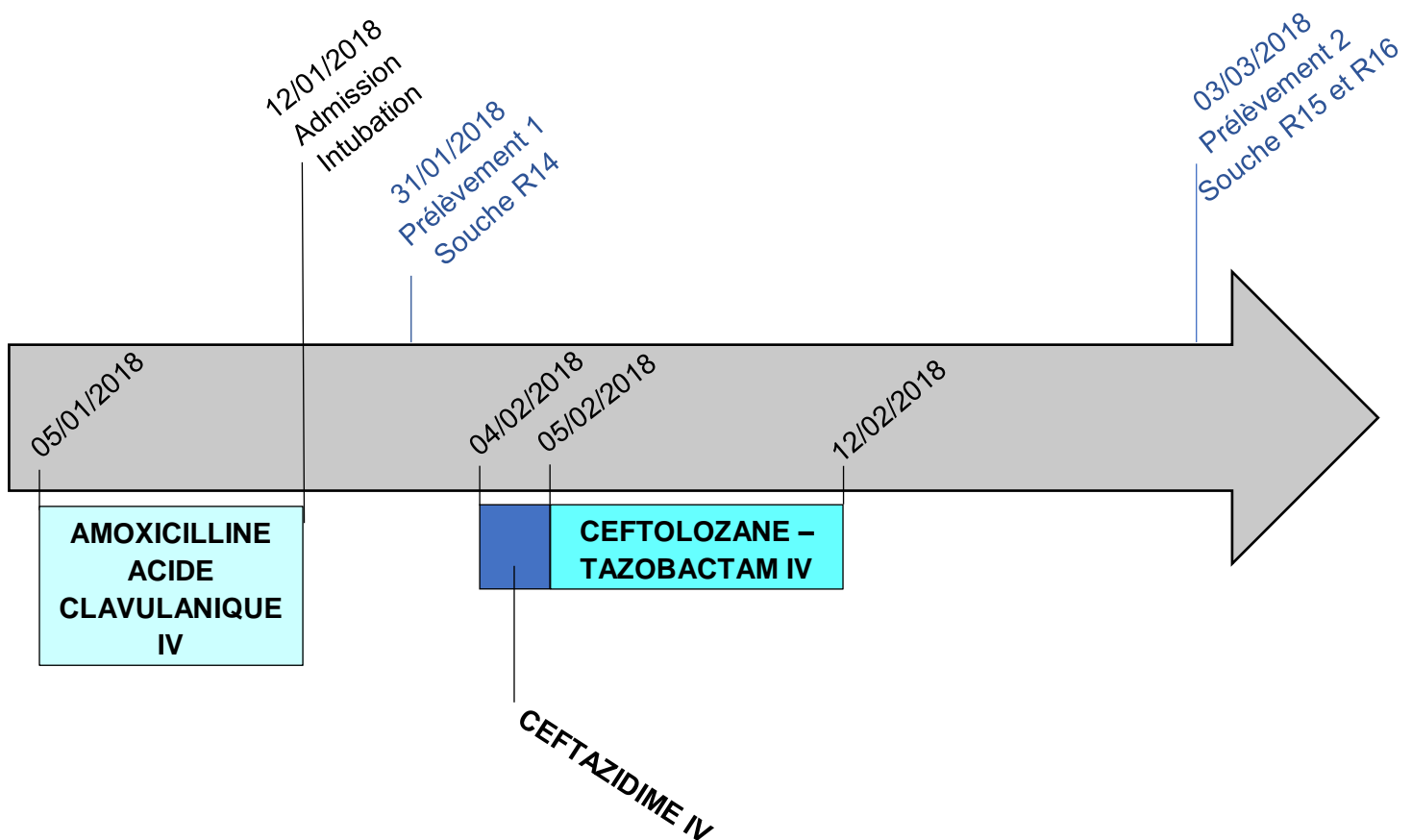
Annexe 4. Contexte clinique et antibiothérapies du patient E

- Homme de 69 ans
- Hospitalisé en réanimation polyvalente pour choc septique sur bactériémie à *Staphylococcus aureus* avec greffe pulmonaire et infection de matériel ostéo-articulaire
- Antécédents : ° Arthrodeèse T12-L5 sur sciatalgies invalidantes
 - ° Fibrillation auriculaire paroxystique
 - ° Deux embolies pulmonaires à bilan étiologique négatif
 - ° Tabagisme sevré



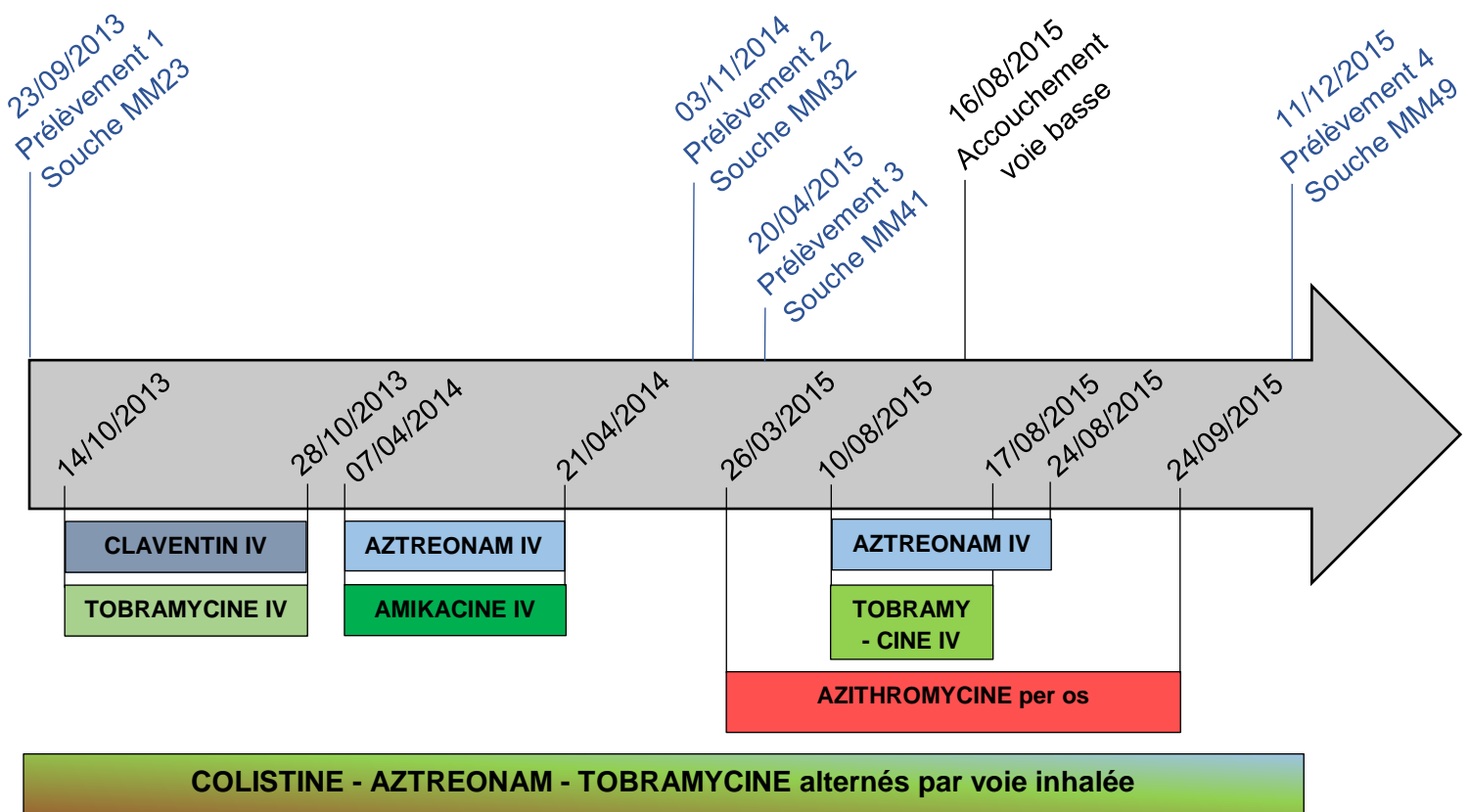
Annexe 5. Contexte clinique et antibiothérapies du patient F

- Homme de 64 ans
- Hospitalisé en Réanimation polyvalente pour choc cardiogénique sur communication inter-ventriculaire
- Antécédents : ° HTA
 - ° Dyslipidémie



Annexe 6. Contexte clinique et antibiothérapies du patient MM

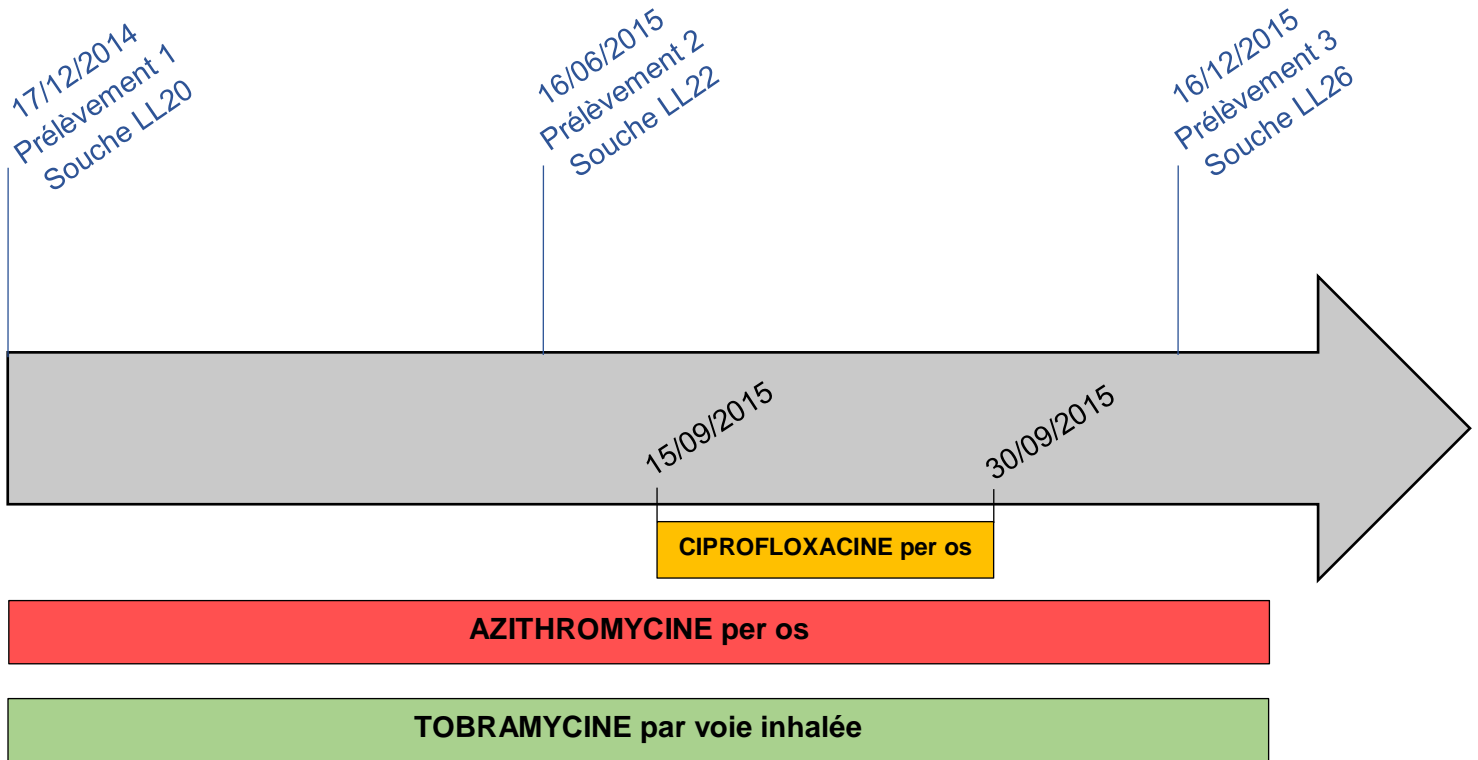
- Femme de 29 ans atteinte de mucoviscidose
- Suivie tous les 3 à 6 mois en alternance en consultations et en hospitalisations de jour
- Pas d'hospitalisation pour pathologie aiguë durant la période des prélèvements. Cures d'antibiotiques IV à domicile et courte hospitalisation pour accouchement voie basse non compliqué autour du 16/08/2015.
- Autre antécédent : allergie prouvée à l'amoxicilline, la ceftazidime et la ceftriaxone



Annexe 7. Contexte clinique et antibiothérapies du patient LL

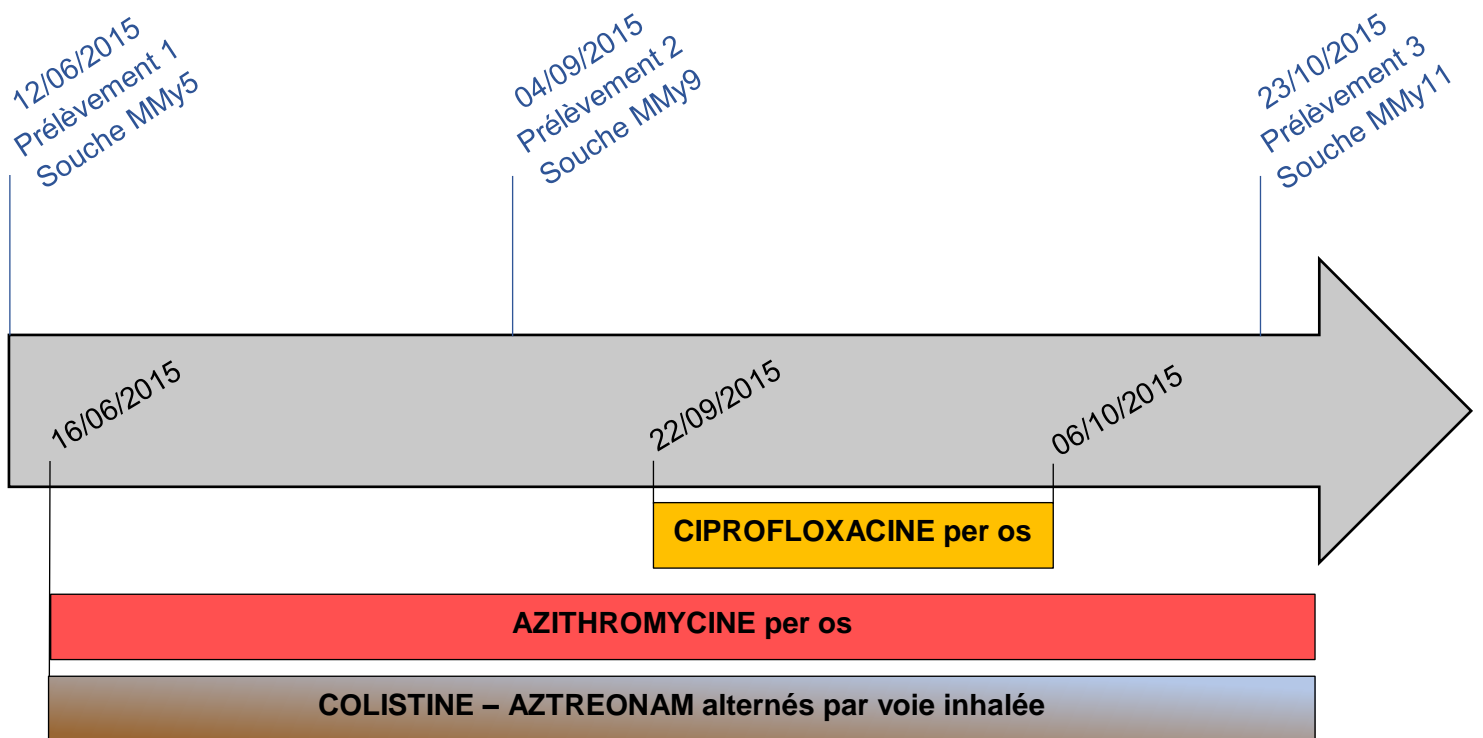
- Jeune fille de 13 ans atteinte de mucoviscidose
- Suivie tous les 3 mois en alternance en consultations et en hospitalisations de jour
- Pas d'hospitalisation pour pathologie aiguë durant la période des prélèvements

- Pas d'autre antécédent notable



Annexe 8. Contexte clinique et antibiothérapies du patient MMy

- Femme de 56 ans atteinte de mucoviscidose, en attente d'une greffe pulmonaire
 - Suivie tous les 3 à 6 mois en alternance en consultations et en hospitalisations de jour
 - Pas d'hospitalisation pour une pathologie aiguë durant la période des prélèvements
- Autres antécédents : ° Tuberculose pulmonaire
° Aspergillose pulmonaire



Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

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

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Résumé :

INTRODUCTION : Les intégrons de résistance sont des structures génétiques bactériennes capables d'acquérir et d'exprimer des gènes de résistance aux antibiotiques sous forme de cassettes ; portés par des plasmides ou des transposons, ils jouent un rôle majeur dans la dissémination de l'antibiorésistance, notamment en médecine hospitalière. L'objectif principal de cette étude était de mettre en évidence d'éventuels réarrangements de cassettes au sein de réseaux de cassettes d'intégrons chez un même patient au cours du temps. Les objectifs secondaires étaient la détermination des caractéristiques clonales des souches étudiées et l'analyse des gènes de résistance acquis hors réseaux de cassettes d'intégrons.

MATERIEL ET METHODES : Les génomes de 28 souches de *Pseudomonas aeruginosa* hébergeant un ou plusieurs intégron(s) de classe 1, provenant de 10 patients du CHU de Limoges (6 patients intubés sous ventilation mécanique, 4 patients atteints de mucoviscidose) ont été séquencés par séquençage haut débit (NGS). Les réseaux de cassettes ont été caractérisés par analyse bioinformatique. La détermination des caractéristiques clonales et la recherche de gènes de résistance hors réseaux de cassettes ont été effectuées *via* différentes plateformes en ligne.

RESULTATS : Nous n'avons pas mis en évidence de mouvement de cassettes d'intégrons au sein des souches bactériennes provenant d'un même patient au cours du temps. Il n'a pas non plus été observé de modification au sein des gènes de résistance acquis hors réseaux de cassettes. Cependant, nous avons découvert quatre réseaux de cassettes jamais décrit auparavant dans des intégrons de classe 1.

CONCLUSION : Notre étude n'a pas permis de démontrer l'existence de mouvements de cassettes au sein de réseaux de cassettes d'intégrons *in vivo*, même en situation de forte pression de sélection antibiotique. Néanmoins notre travail valide une méthodologie technique et bioinformatique intéressante et ouvre la voie à des études complémentaires dans le domaine de la génétique bactérienne et de l'hygiène hospitalière.

Mots-clés : intégrons, cassettes, réarrangements, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiorésistance

Abstract :

INTRODUCTION : Resistance integrons are genetic bacterial structures able to acquire and express resistance genes embedded within cassettes ; carried by plasmids or transposons, they are key players of antibiotic resistance spreading, especially in hospital medicine. The main goal of this study was to show potential cassette rearrangements within integron cassette arrays from a single patient over time. The secondary objectives were to determine the clonal characteristics of the strains we studied, and to analyse acquired resistance genes apart from integron cassette arrays.

METHODS : Genomes from 28 *Pseudomonas aeruginosa* strains, harbouring one or several class 1 integron(s), isolated from 10 patients of the Limoges University Hospital Center (6 were intubated under mechanical ventilation, 4 were suffering from cystic fibrosis), were sequenced using high-throughput sequencing (NGS). The cassette arrays were characterised using a bioinformatics analysis. Determining the clonal characteristics and searching for resistance genes apart from cassette arrays was performed using several online platforms.

RESULTATS : We did not show any change in integron cassette arrays within bacterial strains from a single patient over time. Neither did we observe any modification within resistance genes apart from cassette arrays. However, we discovered four new cassette arrays that have never been described in class 1 integrons before.

CONCLUSION : Our study could not demonstrate any change within integron cassette arrays *in vivo*, even in situations of high antibiotic selection pressure. Though, our work validates an interesting technical and bioinformatics methodology and paves the way to complementary studies in the field of bacterial genetics and hospital hygiene.

Keywords : integrons, cassettes, rearrangements, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance

