

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2007

THESE N° 3348 / 1

**MISE AU POINT D'UNE PCR EN TEMPS REEL MULTIPLEX
POUR LA DETECTION DES 3 CLASSES
D'INTEGRONS DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

présenté et soutenu publiquement

le 30 octobre 2007 à 17h30

par

Olivier BARRAUD

Né le 11 Novembre 1979 à Limoges (87)

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 176087 3

JURY

Monsieur le Professeur Gérard HABRIOUX.....Président
Mademoiselle le Professeur Cécile BEBEAR.....Juge
Monsieur le Professeur François DENIS.....Juge
Madame le Professeur Sylvie ROGEZ.....Juge
Monsieur le Docteur Bruno FRANÇOIS.....Membre invité
Mademoiselle le Professeur Marie-Cécile PLOY.....Membre invité, Directeur de thèse

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique
Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACIE GALENIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE – CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE – CHIMIE MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE – MYCOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE – BIOPHYSIQUE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	NEUROLOGIE, ENDOCRINOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

Remerciements

A Monsieur le Professeur Gérard HABRIOUX, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Limoges, Professeur des Universités de Biochimie, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici toute ma gratitude dans la disponibilité et le soutien que vous m'avez apportés tout au long de mon cursus d'étudiant en pharmacie.

A Monsieur le Professeur François DENIS, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service, Membre de l'Académie Nationale de Médecine, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Votre dynamisme et votre passion pour la microbiologie ont assurément contribué à ma spécialisation dans ce domaine ; travailler au sein de votre équipe est un immense honneur. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Praticien hospitalier, d'avoir accepté de juger ce travail. J'ai pu apprécier votre compétence lors de mon passage comme interne dans le secteur de virologie. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments respectueux.

A Mademoiselle le Professeur Cécile BEBEAR, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Praticien hospitalier, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Mon passage dans le service de Bactériologie de l'hôpital Pellegrin à Bordeaux fut un réel plaisir et restera un excellent souvenir. Trouve en cette thèse l'expression de tout mon respect et de ma profonde sympathie.

A Monsieur le Docteur Bruno FRANÇOIS, Praticien Hospitalier, Directeur du Centre de Recherche Clinique du CHU de Limoges, d'avoir accepté de siéger dans ce jury. J'espère que ce travail permettra de développer des collaborations futures avec le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges.

A Mademoiselle le Professeur Marie-Cécile PLOY, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Praticien hospitalier, de m'avoir encadré dans l'élaboration de ce travail. Ta patience, ton écoute et tes conseils précieux m'auront été d'une grande aide. Travailler à tes côtés m'apporte beaucoup, c'est un honneur et un réel plaisir. Trouve en cette thèse l'expression de toute ma gratitude et de ma profonde sympathie.

Je remercie les personnes qui ont contribué à ce travail :

A Mademoiselle Marie-Claire Baclet, ingénieur responsable de l'Unité de séquençage, pour sa collaboration précieuse dans le succès de ce travail. Ta connaissance de la PCR en temps réel et ta grande implication dans ce projet auront finalement permis de dompter ces fameuses intégrases. Sois assurée de toute ma gratitude.

Au Docteur Didier Mazel, responsable de l'Unité de Plasticité du Génome Bactérien (Institut Pasteur), qui nous a gentiment fourni les bactéries hébergeant le gène *intI3*, sans lesquelles ces travaux n'auraient pu être menés.

A l'ensemble des membres de l'équipe d'accueil EA 3175 pour leur soutien amical et leurs encouragements, notamment Emilie, Martine et Thomas.

Je tiens également à remercier ceux et celles qui ont contribué à ma formation et avec qui j'ai travaillé durant toute ma faculté de pharmacie et mon internat :

Aux Docteurs Geoffrey Masson et Sébastien Hantz pour leur travail de relecture, leurs conseils avisés et bien plus encore. C'est un réel plaisir que de travailler à vos côtés.

A mes co-internes limougeaux et bordelais pour tous les bons moments passés ensemble. A Audrey, Charles, David, Emilie, Hélène, Julie, Loïc, Katarina, Marie-Laurence, Sophie et tous les autres, pour leur amitié.

Aux Docteurs Sophie Alain, Fabien Garnier, Christian Martin et Marcelle Mounier pour leur aide dans ma compréhension du monde complexe de la microbiologie.

A tous les membres du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU Dupuytren, pour la formation et les conseils qu'ils m'ont prodigués. Soyez assurés de toute ma sympathie.

A tout le personnel des laboratoires du CHU de Limoges et du CHU de Bordeaux dans lesquels j'ai eu la chance de travailler, pour leur accueil et leur gentillesse.

A l'ensemble des enseignants de la Faculté de Pharmacie de Limoges qui ont assuré ma formation.

*Ce travail a pu être réalisé dans le cadre de l'équipe d'accueil EA 3175
« Biologie Cellulaire et Moléculaire des Microorganismes », équipe Avenir
Inserm, avec le soutien de l'Université de Limoges et de la Région Limousin.*

A mes parents et grands-parents, avec toute mon affection

A mes Amis, Arnaud, David, Franck et Julien,

Plan

Introduction	10
Rappels bibliographiques	12
I. Les intégrons	14
A. Généralités.....	14
B. Epidémiologie des intégrons de résistance.....	30
II. La PCR en temps réel	43
Introduction à l'étude expérimentale	63
Matériel et méthodes	68
III. Matériels et méthodes	69
Résultats	79
IV. Résultats.....	80
A. Mise au point de la PCR en temps réel multiplex	80
B. Intégrons en microbiologie clinique.....	106
Discussion	117
V. Discussion	118
Conclusion	126
Bibliographie	128

Abréviations

5' CS	5' <i>conserved segment</i> : région 5' conservée
A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
C	cytidine / cytosine
C3G	céphalosporine de 3 ^{ème} génération
BLSE	β-lactamase à spectre élargi
CMI	concentration minimale inhibitrice
dXTP	déoxynucléotide triphosphate
G	guanine
kb	kilobase
M	molaire (mole par litre)
mg.L ⁻¹	milligrammes par litre
mL	millilitre
mM	millimolaire
ng	nanogramme
pb	paires de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>Pc</i>	promoteur des cassettes
<i>Pint</i>	promoteur de l'intégrase
PM	poids moléculaire
qsp	quantité suffisante pour
T	thymine
Tm	<i>melting temperature</i> , point de fusion
μg	microgramme
μL	microlitre
μM	micromolaire
R	purine
Y	pyrimidine

Introduction

Les intégrons sont des supports génétiques bactériens de résistance aux antibiotiques. Ils constituent un système de capture et d'expression de gènes de résistance sous forme de cassettes. Portés par des éléments mobiles tels que les plasmides ou les transposons, ils sont des acteurs majeurs impliqués dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.

Les intégrons, dont il existe 3 classes, ont été décrits chez de très nombreuses espèces bactériennes, notamment au sein des bacilles à Gram négatif, aussi bien chez l'homme ou l'animal que dans l'environnement. Chez l'homme, leur présence est associée à une grande résistance des bactéries hôtes, voire à une multirésistance. Leur détection revêt donc un intérêt majeur sur le plan épidémiologique en terme de surveillance des résistances.

Les techniques actuelles de détection des intégrons, qui s'effectuent par amplification génique, se heurtent à plusieurs problèmes techniques, et notamment à un manque de spécificité de la réaction. Devant cette problématique, il a été décidé de développer une technique de PCR en temps réel multiplex capable de détecter rapidement et de façon spécifique les 3 classes d'intégrons de résistance non seulement au sein de souches bactériennes, mais aussi au sein d'environnements génétiques plus complexes.

Deux applications de la technique ont été menées : la première a porté sur l'analyse de souches isolées d'hémocultures, la seconde sur la détection d'intégrons à partir de liquides biologiques prélevés chez des patients à la phase aiguë d'un sepsis sévère.

Rappels bibliographiques

Les intégrons

I. Les intégrons

A. Généralités

1. Historique

Les intégrons sont des supports génétiques de résistance aux antibiotiques dont la découverte est relativement récente. En 1989, suite à des travaux d'alignements de séquences nucléotidiques, des auteurs australiens ont mis en évidence et désigné sous le terme « intégron » ou « élément d'intégration de l'ADN », une nouvelle famille d'éléments génétiques bactériens capables de promouvoir l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques [1].

Bien que retrouvés au sein de supports génétiques divers (plasmides, transposons), les intégrons ont été décrits comme ayant des propriétés communes : leur organisation leur permet d'intégrer des éléments génétiques grâce à des recombinaisons spécifiques de site, et ils sont de plus capables d'assurer l'expression des gènes intégrés. La structure décrite alors par les auteurs était la même pour tous les intégrons : deux régions conservées (5' *conserved segment* ou 5'CS et 3' *conserved segment* ou 3'CS) encadrent une région dite variable où sont localisés des gènes de résistance aux antibiotiques dont le nombre et la nature diffèrent.

2. Définition

On entend par intégron un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Celles-ci constituent des éléments génétiques mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison spécifique de site, catalysé par une intégrase. Un intégron est en lui-même immobile, mais, porté par des éléments mobiles tels que les plasmides ou transposons, il contribue à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.

La définition moléculaire actuelle d'un intégron se limite à la seule présence de la région 5' conservée (5'CS) : cette structure immobile constitue la plateforme fonctionnelle d'un intégron. Elle est composée de 3 éléments indispensables [Figure 1] :

- un gène *intI* qui code une intégrase,
- un site spécifique de recombinaison *attI*,
- un promoteur *Pc* [2].

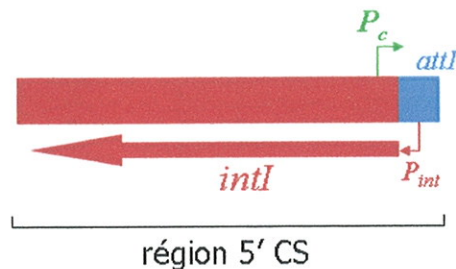


Figure 1 : Structure générale d'un intégron (définition moléculaire).

La définition moléculaire d'un intégron se limite à la région 5' CS (5' conserved segment). Elle est constituée du gène de l'intégrase *intI*, de son promoteur P_{int} , supposé mais non caractérisé à ce jour, du site de recombinaison *attI* et du promoteur des cassettes P_c .

L'intégrase est la protéine qui catalyse l'intégration, mais également l'excision des cassettes situées en aval du site *attI*. L'expression de celles-ci est assurée par le promoteur commun P_c . A noter que le promoteur de l'intégrase P_{int} n'a pas été caractérisé à ce jour ; sa séquence supposée se situerait toutefois dans le site *attI*.

3. Structure des intégrons

Même si la description de la région 5'CS suffit à définir un intégron, il n'en reste pas moins que la plupart des intégrons décrits dans la littérature possèdent en aval de cette plateforme structurale une région variable faite de cassettes [Figure 2]. Les cassettes sont des éléments génétiques constitués de deux éléments : un gène, codant le plus souvent une résistance à un antibiotique, associé à un site de recombinaison *attC*.

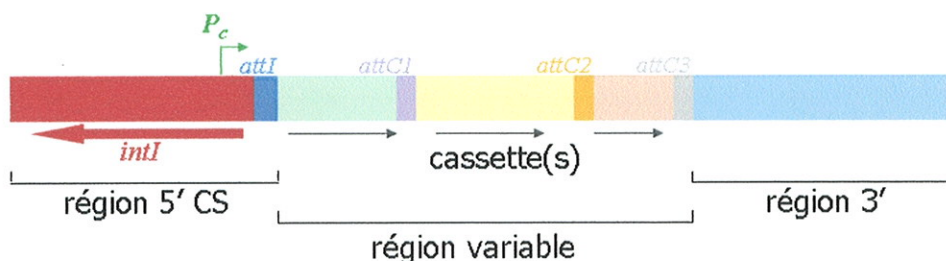


Figure 2 : Structure habituelle d'un intégron.

Classiquement, un intégron est composé d'une région 5' conservée (5'CS) qui constitue la plateforme fonctionnelle avec un gène *intI*, un site *attI* et un promoteur P_c . Encadrée par la région 5'CS et par une région 3', une région dite variable renferme des cassettes. Sont représentées sur cette figure, de façon arbitraire, 3 cassettes avec leur site *attC* respectif.

a. La région 5' conservée (5' conserved segment)

- Le gène *intl* et la protéine IntI

- *Famille des recombinases à tyrosine*

Le gène *intl* des intégrons code une protéine, l'intégrase IntI, qui appartient à la famille des recombinases à tyrosine spécifiques de site [3]. Cette grande famille rassemble des protéines d'origine procaryote et eucaryote (levures) impliquées dans des processus communs de recombinaisons entre deux molécules d'ADN. L'intégrase du phage λ est la protéine référence de cette famille.

L'alignement du site catalytique des différentes protéines a montré qu'elles possédaient toutes des motifs communs, et notamment une tétrade hautement conservée R-H-R-Y (arginine, histidine, arginine, tyrosine) qui assure l'interaction avec la molécule d'ADN. La tyrosine fait partie du site catalytique de la protéine, elle est indispensable à la coupure de l'ADN.

- *Les 5 classes d'intégrons de résistance*

La composition en acides aminés de la protéine IntI d'un intégron permet de définir 5 classes d'intégrons impliquées dans la résistance aux antibiotiques :

- les intégrons de classe 1 sont caractérisés par l'intégrase **IntI1** qui comporte 337 acides aminés, soit une séquence nucléotidique de 1014 paires de bases.
- les intégrons de classe 2 sont caractérisés par l'intégrase **IntI2** qui comporte 325 acides aminés, soit 978 paires de bases. Elle présente la particularité d'être interrompue par un codon stop (TAA) en position 179, ce qui la rend non fonctionnelle [4].
- les intégrons de classe 3 sont caractérisés par l'intégrase **IntI3** qui comporte 346 acides aminés, soit 1041 paires de bases.
- les intégrons de classe 4 et 5 ont été identifiés *via* leur implication dans la résistance au triméthoprime. Ils ont été décrits chez des espèces du genre *Vibrio*, associés à des transposons conjugatifs. Leur implication en microbiologie clinique est considérée comme nulle.

- Le site attI : site spécifique de recombinaison

Il existe autant de sites *attI* que de gènes *intI* : le site *attI1* est toujours associé au gène *intI1*, le site *attI2* au gène *intI2* et le site *attI3* au gène *intI3*. Contrairement aux gènes *intI*, l'alignement des sites *attI* [6] ne montre pas de réelle identité structurale, excepté une séquence de 7 paires de bases GTTRRRY (R : purine, Y : pyrimidine) appelé *core site* [Figure 4].

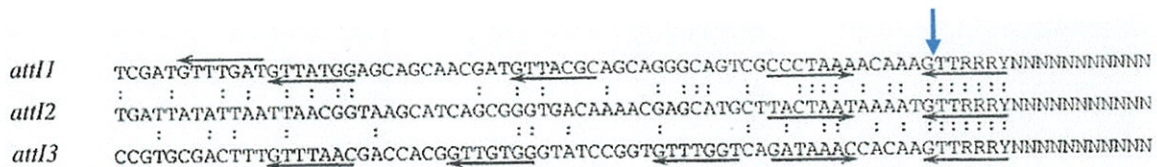


Figure 4 : Alignement des séquences nucléotidiques des sites attI1, attI2 et attI3.
 Une région de 64 paires de bases, suffisante pour l'activité de recombinaison du site *attI1*, est alignée avec les séquences des sites *attI2* et *attI3*. La flèche verticale bleue indique la zone de jonction entre la région 5'CS et la première cassette. D'après [6].

Le site *attI* est un site spécifique de recombinaisons qui comporte des sites d'attachement de l'intégrase IntI. Le site *attI1* est le site qui a été le plus étudié : deux sites possédant le motif consensus GTTR assurent la liaison avec IntI1 : un site de forte liaison, critique pour l'activité de recombinaison et un site de faible liaison qui en améliore l'efficacité [7, Figure 5].

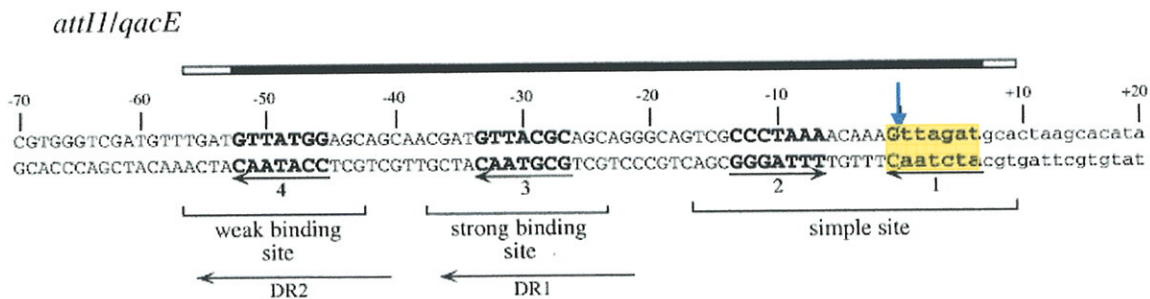


Figure 5 : Organisation du site attI1. Exemple de la jonction attI1/qacE.
 Le rectangle noir définit le site *attI1*. Les rectangles blancs correspondent aux quelques bases supplémentaires impliquées dans la reconnaissance d'IntI1. Sont représentés les sites de liaison d'IntI1 à *attI1* (*weak binding site*, *strong binding site*), ainsi que le site unique (*simple site*, motif formé de 2 séquences inversées répétées séparées par un espace de 6 nucléotides) impliqué dans les recombinaisons *attI x attI*. Les lettres en gras sont reliées à une séquence consensus de 7 paires de bases GTTRRRY appelé *core site* (surligné en jaune) ; DR1 et DR2 sont des séquences directes répétées (*direct repeats*). La flèche verticale bleue indique la zone de jonction entre la région 5'CS et la cassette *qacE*. Elle correspond à la numérotation 0 de la séquence. D'après [7].

Les sites *attI2* et *attI3* ont été moins étudiés. La protéine IntI2, rendue fonctionnelle par modification du codon stop intermédiaire, présente une très forte spécificité pour le site *attI2* et ne peut assurer de recombinaison avec un site *attI1*. IntI1 au contraire est moins spécifique et peut, certes avec une plus faible efficacité, effectuer des recombinaisons avec le site *attI2* [4]. L'organisation du site *attI3* est très similaire à celle d'*attI1* [8].

▪ Le promoteur des cassettes *Pc*

Troisième élément caractéristique de la région 5' CS d'un intégron : le promoteur *Pc*. Ce promoteur joue un rôle fondamental dans la fonctionnalité d'un intégron car il assure l'expression des cassettes situées en aval, ces dernières ne possédant pas la plupart du temps de promoteur propre.

La région promotrice des intégrons de classe 1 a été la plus étudiée. Il existe en réalité deux promoteurs *Pc* : *Pc1* est situé plus de 200 bases en amont de la première cassette, au sein même du gène *intI1*, alors que *Pc2* est localisé environ 90 bases en aval de *Pc1* [Figure 6].

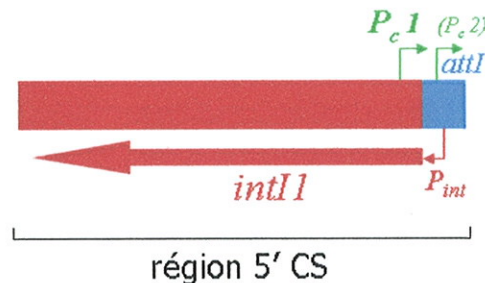


Figure 6 : Région 5' conservée d'un intégron de classe 1.

La région promotrice d'un intégron de classe 1 comporte 2 promoteurs *Pc1* et *Pc2* situé dans *attI1*. Le promoteur *Pc2* est le plus souvent inactif, car l'espacement entre les boîtes -10 et -35 est insuffisant. Le promoteur *Pint* supposé, mais non caractérisé, fait « tête-bêche » avec *Pc2*.

Selon la séquence nucléotidique des boîtes -10 et -35, 3 variants du promoteur *Pc1* [9] ont été caractérisés :

- un variant fort : TTGACA-N₁₇-TAAACT
- un variant faible : TGGACA-N₁₇-TAAGCT
- un variant hybride : TGGACA- N₁₇- TAAGCT

Le promoteur *Pc2* n'est que rarement fonctionnel du fait d'un espacement entre les boîtes -10 et -35 limité à 14 paires de bases (TTGTTA- N₁₄-TACAGT), ce qui est insuffisant

à la fixation de l'ARN polymérase. Néanmoins, chez quelques intégrons de classe 1, suite à l'insertion d'un triplet GGG dans l'espaceur, il redevient fonctionnel. Depuis ces travaux, d'autres variants de *PcI* ont été décrits, mais ils restent minoritaires.

b. La région variable

La plateforme fonctionnelle d'un intégron est capable d'intégrer en aval du site *attI* des gènes sous forme de cassettes [10].

Les cassettes, dont la taille moyenne est de l'ordre de 1000 paires de bases, sont définies par l'association d'un gène et d'un site de recombinaison *attC*, reconnu par l'intégrase *IntI*. Ce sont des unités fonctionnelles indépendantes, non répliquatives, mobilisables de manière individuelle : elles existent sous forme linéaire au sein d'un intégron, mais également sous forme circulaire, à l'état libre [11]. Au sein d'un même intégron, jusqu'à huit cassettes ont été décrites [12], mais ce nombre est parfois nul [13].

▪ Les gènes de cassettes

Concernant les intégrons rencontrés en microbiologie clinique (intégrons des classes 1, 2 et 3), les gènes de cassettes codent le plus souvent une résistance à un antibiotique. Certains néanmoins codent une résistance à un antiseptique, tels les gènes *qac* (résistance aux ammoniums quaternaires *via* un efflux) ; d'autres codent des fonctions totalement inconnues.

Plus de 70 gènes de résistance différents ont été décrits [Tableau 2]. Ils codent des résistances vis-à-vis de la quasi-totalité des familles d'antibiotiques existantes [14, 15] :

- de très nombreux gènes sont impliqués dans la résistance aux β -lactamines : ils codent des β -lactamases dont le spectre est plus ou moins large : simple pénicillinase, β -lactamase à spectre élargi (BLSE), voire carbapénémase.
- la résistance aux aminosides est très fréquente et touche la totalité des molécules commercialisées. La cassette *aadA1* (aminoside adényltransférase) confère par exemple une résistance à la streptomycine et la spectinomycine, la cassette *aac(6')-Ib* (aminoside acétyltransférase) à la tobramycine, la nétilmicine et l'amikacine.

- les gènes *dfr* (synthèse d'une dihydrofolate réductase) confèrent une résistance au triméthoprim.
- les gènes *cat* (synthèse d'une chloramphénicol acétyltransférase) et *cml* (synthèse d'une pompe d'efflux) confèrent une résistance au chloramphénicol.
- les gènes *ere* confèrent une résistance à l'érythromycine, les gènes *lin* aux lincosamides...

Gènes	n° d'accès GenBank	Gènes	n° d'accès GenBank
Gènes de résistance aux bêta-lactamines			
<i>bla P1</i>	Z18955	<i>aacA7</i>	AB114632
<i>bla P2</i>	D13210	<i>aacA8</i>	AY139603
<i>bla P3</i>	U14749	<i>aacA10</i>	U57105
<i>cat1</i>	J92967	<i>aacA11</i>	AJ567827
<i>cat 2a</i>	M95287	<i>catB</i>	L06418
<i>cat 2b</i>	M95287	<i>aac(6)-Ia (aacA1)</i>	M18967
<i>cat 3</i>	L07945	<i>aac(6)-Ib (aacA4)</i>	M21682
<i>cat 5</i>	X58272	<i>aac(6)-Ib'</i>	AF156486
<i>cat 7</i>	X75362	<i>aac(6)-Ic</i>	X12618
<i>cat 9</i>	M55547	<i>aac(6)-Id</i>	Z34241
<i>cat10</i>	U37105	<i>aac(6)-Ie</i>	AF047556
<i>cat11</i>	Z22590	<i>aac(6)-I, 20</i>	AY289608
<i>cat 15</i>	U63835	<i>aac(6)-IIa</i>	M29695
<i>cat 16</i>	AF043100	<i>aac(6)-IIb</i>	L06463
<i>cat 19</i>	AF043381	<i>aac(6)-IIc</i>	AF162771
<i>cat 20</i>	AF024602	<i>aac(3)-Ia (aacC1)</i>	X15852
<i>cat 21</i>	Y10693	<i>aac(3)-Ib</i>	L06457
<i>cat 28</i>	AF231133	<i>aac(3)-Ic</i>	AJ511268
<i>cat 30</i>	AY224165	<i>aac(3)-Id</i>	AB114632
<i>cat 31</i>	AF294655	<i>aac(3)-Ie</i>	AY763497
<i>cat 32</i>	AF315351	<i>aac(3)-IIfa</i>	M88012
<i>cat33</i>	AY289608	<i>aac(3)-IIIfa (aacA7)</i>	U13590
<i>BMP-1</i>	D59436	Gènes de résistance au triméthoprim	
<i>BMP-2</i>	AJ243491	<i>dfrA1</i>	AY605659
<i>BMP-3</i>	AD010417	<i>dfr2d</i>	AJ429152
<i>BMP-4</i>	AF244145	<i>dfrA5</i>	X12368
<i>BMP-6</i>	AD910794	<i>dfrA6</i>	Z86002
<i>BMP-7</i>	AF316077	<i>dfrA7</i>	X55425
<i>BMP-8</i>	AF322577	<i>dfrA12</i>	Z21672
<i>BMP-12</i>	AJ420864	<i>dfrA13</i>	Z39002
<i>BMP-13</i>	AJ512502	<i>dfrA14</i>	S76621
<i>BMP-16</i>	AJ584632	<i>dfrA15</i>	Z85311
<i>ESP</i>	D78375	<i>dfrA15b</i>	AF156486
<i>VIM-1</i>	Y18050	<i>dfrA16</i>	AF077008
<i>VIM-2</i>	AF263519	<i>dfrA16b</i>	AJ131405
<i>VIM-4</i>	AY460181	<i>dfrA17</i>	AY602204
<i>VEB-1</i>	AF010116	<i>dfrB1</i>	U36276
<i>VEB-1a</i>	AF324533	<i>dfrB2</i>	J01775
<i>VEB-1b</i>	AF324534	<i>dfrB3</i>	X72585
<i>VEB-2</i>	AY027870	Gènes de résistance au chloramphénicol	
<i>CES-1</i>	AF156486	<i>catB2</i>	M80188
<i>CES-2</i>	AF326355	<i>catB3</i>	U13890
<i>CES-3</i>	AB113580	<i>catB5</i>	X82455
<i>CJM-1</i>	AJ620676	<i>catB6</i>	AJ223604
<i>IBC-1</i>	AF205529	<i>catB8</i>	AF227506
<i>IBC-2</i>	AF329699	<i>catA</i>	U12338
<i>CTX-M.1</i>	AJ416340	<i>catA4</i>	AF156486
<i>CTX-M.9</i>	AJ416343	<i>catB</i>	AF34958
<i>FSE-1</i>	AB2126603	Gènes de résistance aux aminocyclitol	
Gènes de résistance aux aminocyclitol			
<i>aacIA1a</i>	X12670	<i>catB</i>	AF34958
<i>aacIA1b</i>	M95287	Gènes de résistance aux ammoniums quaternaires	
<i>aacIA2</i>	X68227	<i>qacE</i>	X72585
<i>aacIA3</i>	AF047479	<i>qacF</i>	AF34958
<i>aacIA4</i>	AF364344	<i>qacG</i>	AJ223604
<i>aacIA5</i>	AY602204	Gènes de résistance à la rifampicine	
<i>aacIA6</i>	AY460181	<i>arr-2</i>	AF078527

Tableau 2 : Cassettes décrites chez les intégrons de classe 1, 2 et 3.

En face de chaque gène décrit correspond le numéro d'accès à la banque de données, consultable sur Internet : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. D'après [14].

La plupart des cassettes mentionnées dans le tableau 2 ont été décrites chez des intégrons de classe 1. Les intégrons de classe 2 hébergent souvent les mêmes cassettes (*dfrA1*, *sat*, *aadA1*) [5]; les rares descriptions des intégrons de classe 3 ont montré que ceux-ci hébergent souvent un gène codant une carbapénémase [16]. Certaines cassettes sont retrouvées dans plusieurs classes d'intégrons : par exemple, *aadA1* a été décrit chez les intégrons de classe 1 et 2, *aac(6')-Ib* chez les intégrons de classes 1 et 3.

▪ Le site de recombinaison *attC*

Le site *attC*, dénommé parfois *59-base element*, constitue la définition même d'une cassette [17]. Il s'agit d'un site spécifique de recombinaisons reconnu par l'intégrase IntI. A chaque gène de cassette donné est associé un site *attC* qui lui est propre.

Les sites *attC* diffèrent en séquence et en longueur (57 à 141 paires de bases) en fonction du gène auquel ils sont associés, mais leur organisation palindromique est comparable : aux deux extrémités, se trouvent deux séquences inversées répétées de 7 paires de bases désignées site *core* (GTTRRRY) et site *core* inverse (RYYAAC) [18, Figure 7].

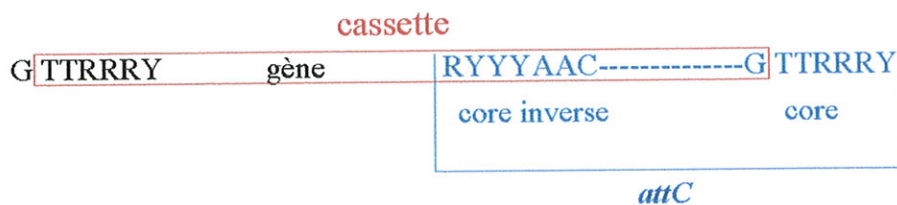


Figure 7 : Structure simplifiée d'une cassette.

Une cassette comporte deux éléments : un gène qui code le plus souvent une résistance à un antibiotique, et un site spécifique de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase. Le point de clivage lors de la recombinaison étant situé entre le G et le T, une cassette débute au premier T du site *core* et englobe le G du site *core* suivant.

En réalité, l'architecture d'un site *attC* est plus complexe que la simple notion des sites *core* et *core* inverse [Figure 8]. A chaque extrémité des sites *attC*, se trouvent deux domaines de 25 paires de bases environ dénommés *simple site*. Ils présentent des séquences inversées répétées imparfaites l'une de l'autre ; ce sont les sites de reconnaissance et de liaison de l'intégrase IntI.

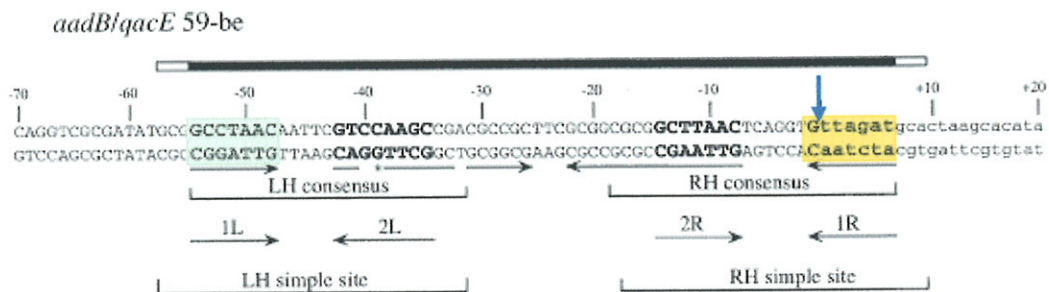


Figure 8 : Organisation du site *attC*. Exemple de la jonction *aadB/qacE*.

Le rectangle noir définit le site *attC*. Les rectangles blancs correspondent aux quelques bases supplémentaires impliquées dans la reconnaissance d'IntI. Le *core site* est surligné en jaune, l'*inverse core site* en vert. Les séquences de liaison à IntI, reliées au *core site*, sont en gras (1L, 1R, 2L, 2R) ; leur orientation est indiquée par des flèches. L'astérisque indique une base supplémentaire en 2L par rapport à 2R. La flèche verticale bleue indique la zone de jonction entre les cassettes *aadB* et *qacE*. Elle correspond à la numérotation 0 de la séquence. LH : *left-hand*, RH : *right-hand*. D'après [7].

A l'image du site *attI*, le site *attC* est un site spécifique de recombinaisons catalysées par l'intégrase IntI. Des différences notables existent entre la liaison de l'intégrase avec un site *attC* et celle avec un site *attI* : la liaison à un site *attC* est beaucoup moins forte [6] et contrairement aux sites *attI* [4, 19], il n'existe pas de spécificité des sites *attC* pour telle ou telle intégrase, preuve en est sans doute la présence de cassettes identiques au sein d'intégrons de classes différentes.

c. La région 3'

En aval de la région variable, se trouve une région dénommée région 3' de l'intégron. Celle-ci revêt un intérêt en terme de résistance uniquement pour les intégrons de classe 1. En effet, chez les intégrons de classe 2, elle comporte des gènes *tns* impliqués dans des fonctions de transposition et chez les intégrons de classe 3, elle est très peu décrite et donc mal connue.

Décrite dès la fin des années 1980 par Stokes et collaborateurs [1], la région 3' des intégrons de classe 1 comporte habituellement 3 séquences codantes [Figure 9] :

- le gène *qacEΔI* (348 pb) code une pompe d'efflux qui confère à la bactérie une résistance aux antiseptiques et désinfectants, notamment vis-à-vis des ammoniums

quaternaires et agents intercalants [20]. Ce gène ne possède pas de promoteur propre, son expression est donc directement dépendante du promoteur *Pc*.

- le gène *sul1* (840 pb) code une dihydroptéroate synthétase indispensable à la synthèse des folates. Celle-ci confère une résistance aux sulfamides.
- La séquence codante *orf5* (501 pb) code une protéine de fonction inconnue. Elle possède une région promotrice propre.

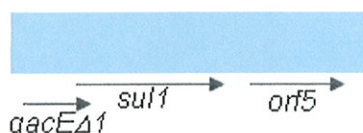


Figure 9 : Région 3' d'un intégron de classe 1.

La région 3' d'un intégron de classe 1 comporte classiquement 3 cadres de lectures : *qacEΔ1*, *sul1* et *orf5*. Les gènes *qacEΔ1* et *sul1* se chevauchent ; l'expression du gène *qacEΔ1* est sous la dépendance de *Pc* ; *sul1* et *orf5* possèdent un promoteur propre.

La région 3' des intégrons de classe 1 a été initialement dénommée région 3'CS (*conserved segment*) à l'image de la région 5'CS. Néanmoins, bon nombre de publications font aujourd'hui état d'intégrons de classe 1 dont la région 3' est absente ou incomplète. C'est la raison pour laquelle la définition d'un intégron est aujourd'hui limitée à la simple présence de la région 5' conservée.

4. Mécanistique des intégrons

a. Les réarrangements de cassettes

L'intégrase IntI1 est capable, *via* des recombinaisons impliquant les sites *attI1* et *attC*, de générer des réarrangements de cassettes au sein d'un même intégron ou entre deux intégrons [2]. Ces capacités de recombinaison ont également été démontrées pour l'intégrase IntI3 [19] et pour l'intégrase IntI2 après mutation de son codon stop intermédiaire [4].

- Excision de cassettes

Les premiers travaux de Collis et Hall dans les années 1990 ont mis en évidence les capacités d'excision d'une ou de plusieurs cassettes par l'intégrase IntI1, suite à une recombinaison entre deux sites *attC* (événement préférentiel) ou entre un site *attC* et *attI* [21]. Cette recombinaison peut s'opérer de deux façons différentes : soit *via* la formation et la résolution de cointégrats entre deux plasmides porteurs d'un intégron, soit *via* l'excision des cassettes sous forme circulaire [11, Figure 10].

- Insertion de cassettes

Outre la possibilité d'insertion de cassettes *via* la formation et la résolution de cointégrats, les cassettes sous forme circulaire peuvent être intégrées au sein de l'intégron *via* une recombinaison entre les sites spécifiques *attC* et/ou *attI*. [22, Figure 10].

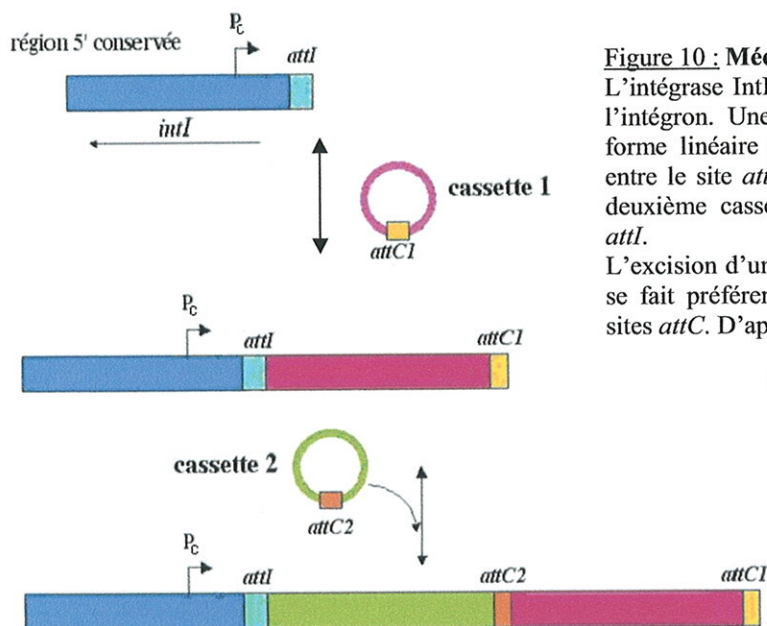


Figure 10 : Mécanisme d'intégration des cassettes.
L'intégrase IntI assure l'insertion d'une cassette dans l'intégron. Une cassette circulaire est intégrée sous forme linéaire par recombinaison spécifique de site entre le site *attI* et son site *attC*. L'intégration d'une deuxième cassette se fait préférentiellement au site *attI*. L'excision d'une cassette est également possible ; elle se fait préférentiellement par recombinaison entre 2 sites *attC*. D'après [15].

Dans le cadre de l'insertion d'une cassette, la recombinaison *attC* x *attI* est préférentielle à une recombinaison *attC* x *attC*. Ceci a pour conséquence de positionner la cassette intégrée juste en aval de la région 5' conservée, au plus près du promoteur *Pc* [23].

A noter qu'il existe une très grande spécificité de chacune des intégrases pour le site *attI* qui lui est associé : ainsi, des recombinaisons d'intégration médiées par IntI1 avec un site *attI2* ou *attI3* sont exceptionnelles [24].

▪ Mécanisme de recombinaison

Le motif indispensable à une recombinaison catalysée par l'intégrase IntI est le motif consensus GTTRRRY. L'événement de crossing-over s'effectue entre le G d'un site consensus et le premier T d'un deuxième site consensus.

L'événement de recombinaison a été finement caractérisé sur le plan moléculaire très récemment [25]. Il implique en réalité le site *attC* uniquement sous sa forme simple brin (brin *bottom*). Les séquences palindromiques des sites *attC* permettent à la molécule d'ADN sous sa forme simple brin d'adopter une conformation repliée qui génère un site de recombinaison double brin [Figure 11]. Le site *attI* reste quant à lui dans une conformation double-brin lors de la recombinaison. Ce mécanisme a été confirmé par la cristallisation de la structure lors de l'interaction de l'intégrase IntI avec un site *attC* [26].

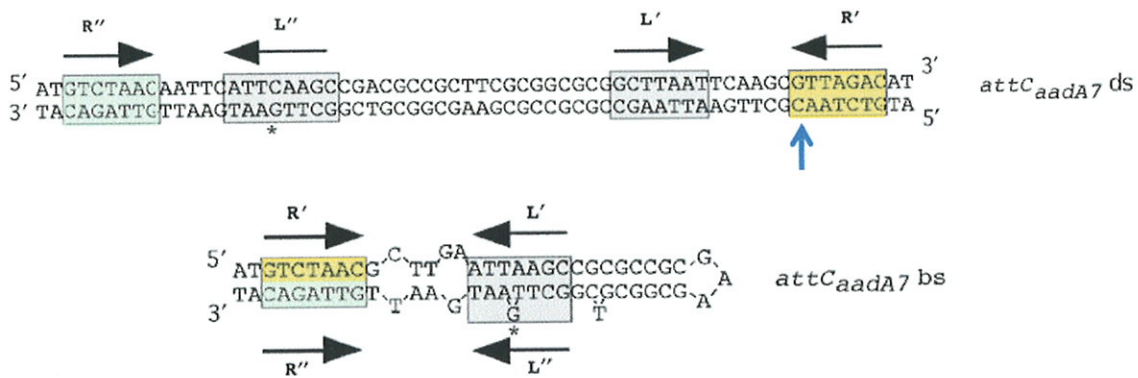


Figure 11 : Séquence du site *attC* de la cassette *aadA7* et structure secondaire du brin *bottom*.

Les séquences inversées répétées L', L'', R', R'' sont indiquées par des flèches noires. L'astérisque indique la base G supplémentaire en L'' par rapport à L'. Les séquences encadrées sont les sites de liaison de l'intégrase. Le *core site* est surligné en jaune, l'*inverse core site* en vert. La flèche verticale bleue indique le site de crossing-over. D'après [25].

L'événement de recombinaison, impliquant directement le *core site*, a pour conséquence de toujours orienter la cassette intégrée dans le même sens, à savoir d'abord le gène, puis son site *attC* [17, 22]. Cette orientation est indispensable pour l'expression du gène.

b. L'expression des gènes de cassettes

La plupart des cassettes intégrées au sein d'un intégron ne possèdent pas de promoteur propre, leur expression est donc directement dépendante du promoteur P_c situé dans la région 5'CS. Il existe néanmoins quelques exceptions, telles que les cassettes *cmlA* et *qac* [27].

Outre la force du promoteur P_c , la position de la cassette au sein d'un intégron est un élément essentiel dans l'expression du gène qu'elle renferme [28]. Il a été montré que les gènes les plus éloignés de P_c sont plus faiblement exprimés que ceux situés à proximité de la région 5'CS. Ainsi, lorsqu'une cassette se situe en première position au sein d'un intégron, le niveau de résistance conféré par le gène qu'elle contient est plus important que lorsque la même cassette est précédée d'une ou de plusieurs autres. La nature de la ou des cassettes situées en amont influence également le niveau d'expression.

c. Effet de la pression de sélection antibiotique

Il est considéré, mais non démontré à ce jour, que la pression de sélection antibiotique favorise les bactéries dont les cassettes ont été réarrangées au sein de l'intégron, de façon telle que les cassettes nécessaires soient localisées au plus près du promoteur P_c [21, 28, Figure 12]. La régulation de l'expression des cassettes au sein d'un intégron en fonction de la pression de sélection antibiotique permettrait ainsi à la bactérie d'avoir à sa disposition des gènes de résistance aux antibiotiques qui ne seraient exprimés qu'en cas de nécessité, réduisant ainsi le coût biologique de la résistance pour la bactérie.

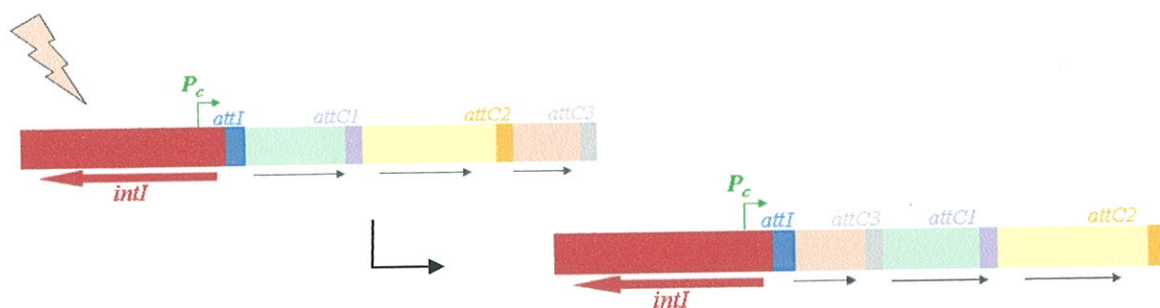


Figure 12 : Effet de la pression de sélection antibiotique sur les réarrangements de cassettes d'un intégron. L'hypothèse émise par Collis et collaborateurs est la suivante : si l'on soumet une bactérie hébergeant un intégron à une pression de sélection par un antibiotique (éclair rose) dont la résistance est codée par la dernière cassette (couleur rose), l'intégrase IntI serait capable d'exciser la dite cassette, puis de la réintégrer en une position plus proche de P_c . Ainsi, l'expression du gène qu'elle renferme est plus forte et la bactérie est capable de résister à l'antibiotique considéré.

5. Les superintégrons

A la fin des années 1990, a été identifiée au sein du chromosome 2 de *Vibrio cholerae*, une structure de plus de 100 kilobases comprenant une nouvelle intégrase, VchIntIA, associée à plusieurs centaines de cassettes. Cette structure d'organisation comparable à un intégron de résistance a été dénommé « superintégron » [29]. D'autres superintégrons ont ensuite été caractérisés sur le génome de différentes espèces de *Vibrio* (*V. mimicus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*...), mais également chez d'autres bactéries de l'environnement : *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Shewanella putrefaciens*... [30].

D'un point de vue structural, un superintégron, porté par le chromosome, reste toujours immobile. La principale différence avec un intégron de résistance réside dans les cassettes [Figure 13] : leur nombre est bien supérieur (plusieurs dizaines, voire centaines), les sites *attC*, nommés dans ce cas VCRs (pour *Vibrio cholerae* repeats), présentent plus de 85 % d'identité entre eux, et enfin la nature des cassettes est différente : même si quelques gènes codant une résistance à un antibiotique ont été décrits, la plupart des cassettes de superintégrons hébergent des gènes dont les fonctions restent inconnues. Quelques gènes codant des fonctions métaboliques ou des facteurs de virulence ont été mis en évidence.

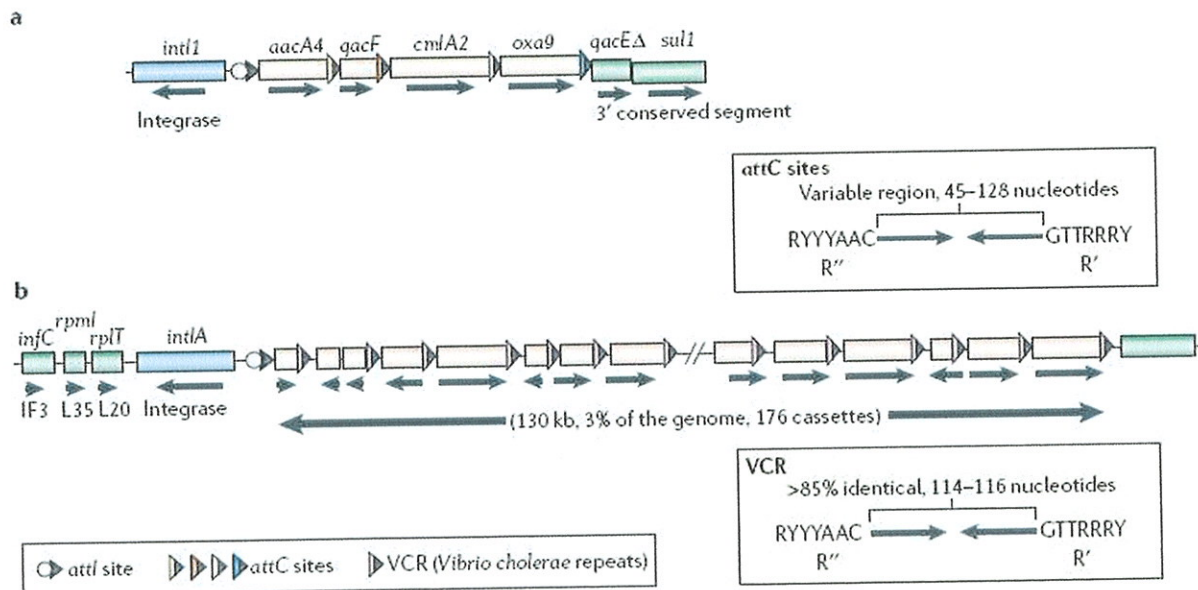


Figure 13 : Comparaison d'un intégron de résistance et d'un superintégron. D'après [31].

- Intégron de classe 1, *In40* [27] portant 4 cassettes de résistance avec des sites *attC* très différents.
- Superintégron de *V. cholerae*, portant 176 cassettes avec une très grande homogénéité entre les sites VCRs. A noter l'orientation parfois inversée de certains gènes de cassettes de superintégrons.

6. Origine des intégrons

La découverte des superintégrons a permis d'émettre des hypothèses très intéressantes quant à l'origine des intégrons de résistance rencontrés en pratique clinique.

Les similitudes structurales entre cassettes de superintégrons et cassettes d'intégrons de résistance laissent à penser fortement que les intégrons de résistance ont pu, *via* leur intégrase, « capturer » différents gènes à partir des *pools* de cassettes des superintégrons. Cette hypothèse est corroborée par plusieurs arguments : certains sites *attC* sont identiques à certains sites VCRs, des gènes de cassettes homologues à ceux des intégrons de résistance ont été identifiés au sein des superintégrons [32]. De plus, il a été montré récemment que l'intégrase IntI1 était capable d'exciser une cassette d'un superintégron afin de l'intégrer au sein de son intégron de résistance [33]. Il est à noter que les cassettes associées aux différents superintégrons semblent être spécifiques d'espèce, ce qui laisse à penser que les superintégrons constituent un énorme réservoir de gènes.

Par ailleurs, les analyses phylogénétiques des ADN codant les intégrases ont montré que les intégrons étaient des structures très anciennes [31], qui existaient bien avant l'introduction des antibiotiques, preuve en est la présence de superintégrons chez une souche de *Vibrio metschnikovii* datant de 1888 [29]. Les intégrons ont sans doute coévolué avec les génomes bactériens durant des centaines de millions d'années, subissant des transferts latéraux nombreux, tout en conservant des homologies très fortes, comme en attestent les dendrogrammes établis à partir des intégrases des bactéries marines et d'eau douce [31, 34].

Il reste encore beaucoup à explorer en ce qui concerne l'origine et l'évolution des intégrons. Leur présence décrite dans près de 10 % des génomes bactériens séquencés atteste de leur rôle majeur dans l'évolution [34]. De nouvelles intégrases sont régulièrement décrites [35, 36], et les tous derniers travaux qui ont mis en évidence des intégrases jusqu'alors inconnues dans des cheminées hydrothermales du fond des océans, permettront peut-être de mieux comprendre l'origine et la complexité de ces éléments génétiques [37].

B. Epidémiologie des intégrons de résistance

La prévalence des intégrons de résistance (intégrons de classe 1, 2 et 3) dans le monde vivant est majeure. Des centaines de publications font état de leur présence aussi bien dans l'environnement (rivières, eaux usées...) que chez l'animal (selles de différents animaux, litière de poulets...) ou qu'en microbiologie clinique.

1. Les 3 classes d'intégrons de résistance

a. Intégrons de classe 1 : la plus grande prévalence

Une très large majorité de publications est consacrée à la description d'intégrons de classe 1. Ils ont été les premiers découverts, les plus étudiés et restent les plus décrits dans la littérature à ce jour, quelles que soient leurs origines (humaine, animale, environnementale) et les bactéries qui les hébergent. La plupart des références mentionnées dans les paragraphes suivants concernent des intégrons de classe 1.

Même s'il est légitime de penser que les intégrons de classe 1 sont les plus prévalents des intégrons de résistance, il faut néanmoins garder à l'esprit qu'ils sont recherchés en priorité et qu'il existe donc des biais de détection des deux autres classes d'intégron. De nombreux auteurs font le choix de ne s'intéresser qu'à la recherche des intégrons de classe 1. Ce raisonnement est basé sur des considérations historiques, financières, mais aussi sur le fait que la majorité des travaux sont menés sur des bactéries multirésistantes. Or, la très grande variabilité en cassettes des intégrons de classe 1 [Tableau 2] permet de conférer des résistances bien plus diverses et nombreuses que celles conférées par les cassettes plus stables et moins variées des autres classes d'intégrons. Il est donc logique de détecter beaucoup plus souvent des intégrons de classe 1, notamment en microbiologie clinique.

La quasi-totalité des cassettes décrites dans le tableau 2 ont été isolées au sein d'intégrons de classe 1. Cette très grande diversité, qui permet à la bactérie hôte de résister souvent à plusieurs familles d'antibiotiques simultanément, est à l'origine de leur succès, notamment en microbiologie humaine.

b. Intégrons de classe 2 : la stabilité

Bien qu'*a priori* moins répandus, les intégrons de classe 2 n'en restent pas moins fort intéressants par leur organisation structurale. Ces intégrons présentent une stabilité dans leur organisation qui est assez remarquable : ils sont systématiquement associés à un transposon de la famille du transposon Tn7 [38] et arborent une structure en cassettes quasi immuable, avec la présence des trois cassettes *dfrA1*, *sat* et *aadA1* (certaines comme *dfrA1* parfois absentes) et d'une séquence *orfX* [4]. Dans la région 3', se trouvent les gènes *tns* nécessaires à la transposition [Figure 14].

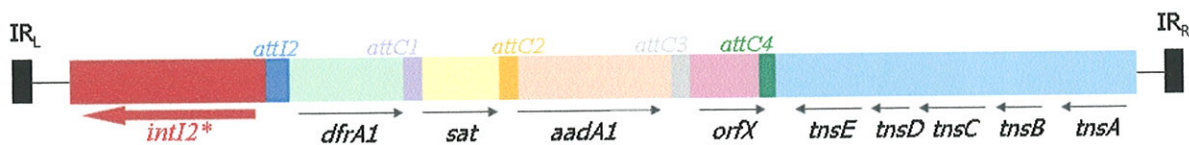


Figure 14 : Organisation usuelle d'un intégron de classe 2 associé à la famille du transposon Tn7.

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

Cette stabilité de l'agencement des cassettes peut vraisemblablement être attribuée à la non fonctionnalité de l'intégrase *IntI2*. Néanmoins, le fait d'être associé au transposon *Tn7* confère à l'intégron une mobilité importante, tant au sein de chromosomes bactériens [39] que de plasmides conjugatifs [40].

De rares publications font état d'arrangements de cassettes différents, avec par exemple la seule présence de la cassette *sat2* [41], la présence d'une cassette *ere(A)* qui code une résistance aux macrolides [42], ou encore l'insertion d'une cassette *aadB* (résistance à la gentamicine, la kanamycine et la tobramycine), d'une pseudocassette *catB2* (résistance au chloramphénicol) déléetée de son site *attC* et une duplication de *sat2* au sein d'un arrangement très inhabituel [43]. L'épidémiologie des intégrons de classe 2 risque d'être prochainement chamboulée suite à la description récente d'un intégron de classe 2, certes toujours associé à un transposon de la famille *Tn7*, mais qui héberge 9 gènes codant des fonctions inconnues, et surtout une intégrase dénuée de codon stop intermédiaire [44]. Or, Hansson et collaborateurs [4] ont montré qu'en mutant le codon stop, l'intégrase *IntI2* devenait une intégrase fonctionnelle capable de catalyser des réarrangements de cassettes.

c. Intégrons de classe 3 : la rareté

Moins d'une dizaine de publications font état de la description d'intégrons de classe 3. Pourtant, ceux-ci présentent des caractéristiques comparables aux intégrons de classe 1, avec notamment une intégrase IntI3 fonctionnelle, douée des mêmes capacités de recombinaisons que l'intégrase IntI1 [19].

La première description d'un intégron de classe 3 remonte à 1995 au Japon [45] chez une souche de *Serratia marcescens* avec une cassette *bla_{IMP-1}* codant une carbapénémase, et un gène *aac(6')-Ib-like* codant une résistance à la tobramycine, la nétilmicine et l'amikacine. Au Portugal en 2003 a été décrit chez une souche de *Klebsiella pneumoniae*, un intégron de classe 3 avec une cassette *bla_{GES-1}* codant une β -lactamase à spectre élargi (BLSE) et une cassette issue de la fusion de *bla_{OXA-10}* et d'*aac(6')-Ib* codant une résistance à la kanamycine [46]. Quelques rares autres intégrons de classe 3 ont été décrits au Japon, notamment chez *Pseudomonas putida*, mais sans caractérisation complète de l'intégron [47].

A l'image des intégrons de classe 2, l'épidémiologie des intégrons de classe 3 risque d'évoluer dans les prochaines années suite à la découverte toute récente de deux souches environnementales du genre *Delftia*, isolées à partir d'eaux usées, qui possèdent un intégron de classe 3 [48]. Les deux intégrons décrits hébergent, non pas des cassettes de résistance aux antibiotiques, mais des cassettes dont les gènes codent des fonctions jusqu'alors inconnues. Qui plus est, ces cassettes sont suivies de gènes vraisemblablement impliqués dans des rôles de transposition. Ces données laissent suggérer que même si les intégrons de classe 3 semblent jouer un rôle mineur en microbiologie clinique, leur impact au niveau environnemental est peut-être non négligeable.

d. Intégrons chimériques

Des publications font état d'intégrons « chimériques » ou « hybrides ». A été décrit un intégron de classe 2 possédant en aval des cassettes, la région 3' complète d'un intégron de classe 1 avec les trois gènes *qacEΔ1*, *sulI* et *ORF5* [49]. D'autres publications font état de la présence des 3 cassettes *dfrA1*, *sat*, *aadA1*, normalement associées aux intégrons de classe 2, au sein d'intégrons de classe 1 [50, 51].

Ces données tendent à montrer que des échanges, vraisemblablement médiés par l'intégrase IntI1, surviennent entre intégrons de classes différentes.

2. Les bactéries hôtes

a. Bactéries à Gram négatif

La quasi-totalité des intégrons décrits sont hébergés par des bactéries à Gram négatif. La majorité des publications concernent les entérobactéries, mais d'autres familles bactériennes sont également concernées.

▪ Entérobactéries

Quasiment toutes les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* ont été décrites comme porteuses d'intégrons notamment *Escherichia coli* qui est le représentant le plus important [12, 52, 53, 54], *Klebsiella* [46, 69], *Serratia* chez qui a été isolé le premier intégron de classe 3 [45, 56] ou encore *Enterobacter* [27, 57]. De nombreux travaux indiquent la présence d'intégrons chez les espèces des genres *Salmonella* [58, 59, 60] et *Shigella* [61, 62, 63], parfois responsables de diarrhées épidémiques. *Shigella sonnei* est un hôte fréquent des intégrons de classe 2. Les descriptions au sein d'autres genres (*Proteus*, *Morganella*, *Yersinia*...) restent plus anecdotiques [50, 51, 64].

▪ Autres bacilles à Gram négatif

Pseudomonas aeruginosa est un hôte fréquent des intégrons de résistance [13, 65, 66, 67]. Les cassettes hébergées par cette bactérie codent souvent des résistances vis-à-vis des β -lactamines, et notamment vis-à-vis des carbapénèmes.

Acinetobacter baumannii est également souvent impliqué comme hôte des intégrons, particulièrement certaines souches épidémiques [43, 49, 68, 69].

Les intégrons de résistance concernent de nombreuses autres genres bactériens à Gram négatif, mais dont les descriptions sont plus rares, voire exceptionnelles : *Campylobacter* [70, 71], *Aeromonas* [72, 73], *Stenotrophomonas* [74, 75], *Vibrio* [76, 77], *Helicobacter* [78], *Bordetella* [79, 80], *Burkholderia* [81]...

b. Bactéries à Gram positif

Quelques publications font état de la description d'intégrons chez des bactéries à Gram positif. Le premier intégron, certes incomplet, identifié chez une bactérie Gram positif, a été décrit chez *Mycobacterium fortuitum* [82]. Par la suite, un intégron complet, associé à une cassette *aadA2a* (résistance à la streptomycine et à la spectinomycine) a été mis en évidence chez une souche de *Corynebacterium glutamicum* [83], puis un autre au sein de la même espèce avec cette fois-ci une intégrase interrompue [84].

Certains éléments suggèrent que les intégrons sont présents parmi les bactéries à Gram positif à une prévalence beaucoup plus importante que la petite dizaine de publications qui en font état ne le laisse paraître : description d'une cassette *aadA* chez une souche d'*Enterococcus faecalis* [85], présence d'*orf513* (séquence associée à certains types d'intégrons) chez une souche d'*Enterococcus faecium* et une souche de streptocoque du groupe G [86], présence du gène *qacEΔ1* chez des dizaines de souches de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* [87]. Enfin, une publication récente a montré que les bactéries à Gram positif constituent un réservoir majeur d'intégrons dans les litières de volailles [88], reléguant les bactéries à Gram négatif porteuses d'intégrons à un rôle mineur. Plus grave, une étude chinoise s'intéressant à des souches cliniques de *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* a mentionné une prévalence en intégrons de 100 % avec certes toujours la même organisation en cassette [89].

3. Place des intégrons de résistance dans l'environnement

a. Une très large répartition, de fortes prévalences

▪ Eaux et sols

Le milieu aquatique naturel (rivières, estuaires, lacs...) est une source potentielle d'intégrons de résistance. Les publications qui en font état ne manquent pas. Rosser et collaborateurs ont rapporté dès 1999 une prévalence de 3,6 % d'intégrons de classe 1 à partir de 3000 bactéries à Gram négatif isolées d'un estuaire en Ecosse [90] ; en 2006, la prévalence du gène *intI1* chez des bactéries résistantes à l'ampicilline isolées d'un estuaire fortement

pollué du Portugal était de près de 30 % parmi les entérobactéries et plus de 20 % parmi les bactéries du genre *Aeromonas* [91]. Une équipe indienne qui s'est intéressée à la présence d'intégrons chez des bactéries multirésistantes (à au moins 5 antibiotiques) isolées d'une rivière a montré une prévalence de 40% des intégrons de classe 1 [92]. L'analyse de l'eau du fleuve Rio Grande entre le Mexique et les Etats-Unis a également montré la présence d'intégrons de classe 1 et 2 dans des souches d'*Escherichia coli* [93]. De façon plus surprenante, ont aussi été découverts des intégrons de classe 1 chez des espèces *a priori* non impliquées en pathologie humaine, isolées du sol [94].

Les piscicultures et aquacultures ont également été décrits comme réservoir d'intégrons de résistance [95, 96]. Les bactéries du genre *Aeromonas* semblent être particulièrement impliquées dans le portage des intégrons, comme le montrent les travaux d'une équipe danoise où la présence d'intégrons de classe 1 concerne 45% des bactéries testées [97]. Les usines de traitement des eaux usées, les égouts et autres lieux où la pollution est majeure constituent assurément l'un des principaux réservoirs hydriques en intégrons de résistance [98, 99] : ces environnements sont de plus très propices à des transferts latéraux de gènes de résistance [100]. A noter que les cassettes retrouvées dans ce type d'environnement codent la plupart du temps des résistances au triméthoprim (cassettes *dhfr*) et aux aminosides (cassettes *aadA1* notamment).

▪ Monde animal

Les intégrons de résistance ont été mis en évidence chez des bactéries commensales ou pathogènes isolées chez de nombreuses espèces animales, qu'elles soient domestiques ou sauvages : chien, cheval, animaux de zoo, tortues, poissons, mouettes, rennes... [101-107].

Outre les piscicultures et aquacultures mentionnées précédemment, le plus grand réservoir animal en intégrons de résistance concerne assurément les animaux de la ferme : le bétail [44, 108], les porcs [109, 110] et la volaille notamment [70, 88, 109, 111]. Une publication rapporte par exemple une prévalence de 34 % de souches de salmonelles isolées d'animaux de la ferme positives en *intII* [112], une autre fait état d'une prévalence de 30 % d'intégrons de classe 1 sur plus de 300 souches d'*Escherichia coli* testées [113]. Les volailles sont un réservoir majeur d'intégrons de résistance : une étude de 2004 réalisée en Chine montre une prévalence en intégrons de classe 1 de près de 50 % chez des souches d'*Escherichia coli* isolés de poulets malades [109]. Nandi et ses collaborateurs [88], qui se

sont intéressés à la litière de poulet, ont montré une prévalence en intégrons de classe 1 de quasiment 100 %, imputable essentiellement aux bactéries à Gram positif qui représentent plus de 85 % des bactéries présentes. Ce portage important en intégrons de résistance par les bactéries à Gram positif a été retrouvé sur le sol de porcheries et sur des échantillons de selles au sein de bactéries du genre *Arthrobacter* et *Corynebacterium* avec une prévalence non négligeable pour ces seules espèces : 12 % à partir du sol, 17 % à partir des selles [110]. Plus préoccupant encore, Barlow et collaborateurs qui ont travaillé directement à partir de l'ADN total extrait d'échantillons de selles bovines, rapportent une prévalence en intégrons de classe 1 de 86 % et de classe 2 de 94 %, alors que les chiffres correspondant à la culture bactérienne classique ne sont que de 50 % et 28 % respectivement [114].

- Produits alimentaires

Les produits dérivés de la viande ont été l'objet d'études visant à détecter des bactéries hébergeant des intégrons. Un intérêt particulier a concerné les bactéries du genre *Salmonella*. Une étude américaine en 2001 s'est penchée sur de la viande hachée et a montré que sur 200 échantillons, 20 % renfermaient des salmonelles et que près de 50 % de celles-ci étaient porteuses d'intégrons [115]. Des études comparables ont montré des fortes prévalences en intégrons de résistance : en 2004 sur de la viande achetée en Chine et aux Etats-Unis, 54 % des salmonelles résistantes à au moins deux antibiotiques, étaient porteuses d'intégrons [116] ; en 2005, en Allemagne, la prévalence parmi des salmonelles résistantes à au moins deux antibiotiques, isolées de produits alimentaires, a atteint un taux de 65 % en intégrons de classe 1 et 10 % en intégrons de classe 2 [117]. Une étude norvégienne a rapporté une prévalence en intégrons de 18 % (classe 1 : 12 %, classe 2 : 6 %) parmi des souches d'*Escherichia coli* résistants à au moins un antibiotique testé isolés de viande et produits de la viande d'origine bovine, ovine, porcine ou aviaire [118].

La présence d'intégrons d'origine animale au sein de la chaîne alimentaire est un réel problème : outre les conséquences cliniques pour le patient, une dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques s'opère. Une étude portugaise a montré en 2004, le transfert d'une souche de *Salmonella* Typhimurium hébergeant un intégron de classe 1 avec une cassette de résistance aux β -lactamines, chez des patients ayant ingérés de la graisse de porc et des saucisses [119].

b. Usage des antibiotiques et environnement

Malgré un usage désormais limité et contrôlé, du moins en Union Européenne, les antibiotiques sont et ont été utilisés en grandes quantités dans le monde agricole, non seulement à visée prophylactique et/ou thérapeutique, mais aussi comme facteurs de croissance.

Les différents articles précédemment cités tendent à montrer que l'usage parfois intensif d'antibiotiques, que ce soit dans les piscicultures, les porcheries, les poulaillers, ou encore les étables, semble être associé à une forte prévalence en intégrons de résistance. Ce « sentiment » est accentué par une publication qui s'est intéressée à des bovins issus d'une ferme écossaise pratiquant l'agriculture biologique où l'usage des antibiotiques y est limité. A été rapportée une prévalence en intégrons de classe 1 très faible, inférieure à 5 %, parmi les *Escherichia coli* résistants isolés [120]. Néanmoins, l'impact de l'antibiothérapie sur les intégrons de résistance reste difficile à évaluer comme le montre une étude menée récemment dans des poulaillers où malgré une absence d'utilisation d'antibiotiques, la prévalence en intégrons de classe 1 reste importante, et ne semble pas inférieure à celle retrouvée dans des fermes où l'usage des antibiotiques y est systématique [121]. Une autre étude menée par Skurnik et ses collaborateurs en 2006 [122] apporte des éléments très intéressants quant à l'impact de l'homme et donc indirectement des antibiotiques sur les résistances dans le monde animal. Des bactéries de l'espèce *Escherichia coli* ont été isolées à partir de selles animales réparties en trois groupes : des animaux sauvages (avec des sous-groupes d'animaux exceptionnellement exposé à des humains, d'autres vivants dans une zone à faible densité humaine et d'autres encore vivants dans une zone à forte densité humaine), des animaux de ferme et des chiens. Il a été montré que plus la présence de l'homme est proche, plus les résistances sont importantes. Quant à la présence d'intégrons, elle n'a été retrouvée que chez les bactéries isolées d'animaux de ferme et des chiens.

4. Place des intégrons en microbiologie humaine

C'est dans ce secteur qu'est recensé le plus grand nombre d'intégrons. Des centaines de publications décrivent la présence d'intégrons de résistance à partir de souches isolées en clinique. Ils ont été mis en évidence chez de très nombreuses espèces bactériennes à Gram

négatif (famille des entérobactéries notamment), à partir de quasiment tout type de prélèvement : urines, selles, hémocultures... , et chez tout type de patients. Leur distribution mondiale concerne tous les hôpitaux, ce qui pose un problème majeur en pratique clinique car leur présence est associée à une plus grande résistance aux antibiotiques.

a. Prévalence

Il est difficile d'évaluer la prévalence en intégrons de résistance en microbiologie clinique : elle dépend de nombreux paramètres liés à la bactérie elle-même, au patient, à sa pathologie, au lieu d'hospitalisation... Les données les plus abondantes concernent les bactéries isolées du tractus urinaire et d'hémocultures.

Concernant les bactéries isolées d'infections urinaires, la plupart des études fournissent des prévalences élevées. Par exemple, une étude australienne note une prévalence de près de 50 % en intégrons à partir de souches tout venant, sélectionnées sans tenir compte de leurs résistances [123]. Une autre étude coréenne comparable qui s'est intéressée à l'espèce *Escherichia coli* révèle une prévalence stable entre 1980 et 2002, aux alentours de 54 % pour IntI1 et 5 % pour IntI2 [124].

Les prévalences calculées à partir des bactéries isolées d'hémocultures sont plus rassurantes avec par exemple un taux de 10,9 % rapporté par une étude norvégienne en 2004 sur 192 entérobactéries, quel que soit leur phénotype de résistance [125]. Une étude allemande basée sur 700 entérobactéries isolées d'hémocultures donne également une prévalence plutôt faible, mais, fait inquiétant, celle-ci augmente de façon significative au fil des années passant de 4,7 % en 1993 à 9,7 % en 1996 pour atteindre 17,4 % en 1999 [126].

b. Lien entre intégrons et résistance

Les travaux menés par différentes équipes montrent que la présence des intégrons est statistiquement associée à une augmentation de la résistance bactérienne. Preuve en est la prévalence bien plus élevée dès lors que les auteurs se concentrent sur des bactéries résistantes : le chiffre de 10,9 % cité précédemment dans l'étude norvégienne [125] passe à

37 % si l'on considère les bactéries résistantes à au moins un des antibiotiques testés. Une étude américaine concernant des bactéries *Escherichia coli* et *Klebsiella sp.* multirésistantes donne une prévalence en intégrons de classe 1 de 57 % [127]. Une autre étude montre que parmi des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes résistantes au cotrimoxazole, 63 % étaient porteuses d'intégrons de classe 1 [128].

Les travaux de Martinez-Freijo dès 1998 ont souligné l'association entre intégrons et moindre sensibilité bactérienne aux antibiotiques [129]. Leverstein-van Hall et collaborateurs ont clairement montré en étudiant près de 900 souches d'origine hospitalière et communautaire qu'il existe une relation significative entre les intégrons et les entérobactéries résistantes à au moins 2 antibiotiques testés, et ce, quelles que soient l'espèce considérée ou son origine [130]. La prévalence en intégrons parmi les entérobactéries analysées était de 71 %. Deux conclusions ont émané de cette étude : il a été montré que la résistance à chacun des antibiotiques testés (tobramycine, gentamicine, cotrimoxazole, sulfaméthoxazole, ciprofloxacine, amikacine, céfuroxime, ceftriaxone, pipéracilline/tazobactam, amoxicilline/acide clavulanique, pipéracilline, ampicilline) était significativement associée aux intégrons et que la résistance au sulfaméthoxazole, au cotrimoxazole, à la gentamicine, à la tobramycine, à l'ampicilline, à la pipéracilline, ou au céfuroxime était prédictive de la présence d'un intégron. A noter que nombre de travaux [123, 125] soulignent la prédominance des cassettes *dfr* et *aad* qui confèrent une résistance respective au triméthoprim et aux aminosides.

c. Effet de la pression de sélection antibiotique

La relation étroite entre intégrons et résistance laisse à penser que la pression de sélection antibiotique joue un rôle majeur dans l'émergence des bactéries multirésistantes isolées en clinique et donc dans l'émergence de bactéries porteuses d'intégrons.

Cette pression s'exerce particulièrement à l'hôpital, notamment dans les services où la consommation d'antibiotiques est importante, comme par exemple les services de réanimation et de soins intensifs. C'est généralement dans ces secteurs que la prévalence en intégrons est la plus forte. Néanmoins, la vision que l'on a de la pression de sélection antibiotique est quelque peu biaisée par le fait qu'elle ne porte que sur des germes hospitaliers, isolés en

situation clinique. Il est nécessaire de pouvoir comparer les multiples données obtenues à l'hôpital avec d'autres issues de la communauté et de bactéries de portage.

Très peu de publications s'intéressent à la prévalence des intégrons chez l'homme en dehors d'un cadre hospitalier. En 2002, le prélèvement rectal de patients le jour de leur admission à l'hôpital a montré une prévalence en intégrons de 19 % parmi les entérobactéries isolées, chiffre non négligeable qui contribue vraisemblablement à la multirésistance à l'hôpital [131]. Des travaux récents se sont intéressés au portage en intégrons d'*Escherichia coli* intestinaux isolés de trois groupes de patients aux modes de vie différents qui n'avaient pas pris d'antibiotiques depuis plus d'un mois [132] : des Amérindiens de Guyane française, des fermiers élevant des porcs et enfin des cadres du secteur bancaire et des assurances vivant en milieu urbain. Les résultats ont été les suivants : la prévalence significativement la plus importante a concerné les éleveurs de porcs (18,5 % d'intégrons de classe 1, 7,4 % de classe 2), suivie des cadres (12,2 % et 4,1 %) et enfin les Amérindiens (6,4 % et 1,3 %). Ces résultats montrent à la fois que des intégrons peuvent persister dans des bactéries commensales malgré l'absence de traitement antibiotique récent, et deuxièmement, que le mode de vie joue un rôle majeur dans le portage des intégrons.

Le cas du Royaume-Uni apporte un exemple particulièrement intéressant concernant les intégrons et la pression de sélection par les antibiotiques et mérite de s'y attarder quelque peu. En 1995, le gouvernement britannique a décidé de limiter le plus possible l'usage du cotrimoxazole (association triméthoprimine et sulfaméthoxazole, commercialisé sous le nom Bactrim®) dans le traitement des infections urinaires, suite à des essais cliniques montrant une efficacité équivalente du triméthoprimine seul et à des cas d'allergie imputés au sulfaméthoxazole. Le fait de limiter considérablement la pression de sélection par les sulfamides laissait augurer d'une baisse de la prévalence des intégrons de classe 1. Or, une étude publiée dans *The Lancet* en 2001 [133] qui a comparé la prévalence en intégrons de classe 1 chez des *Escherichia coli* isolés de différents prélèvements en 1991 et en 1999 n'a pas montré de baisse significative : 16,4 % de souches positives en 1991 *versus* 17,5 % en 1999. Ces résultats mettent en avant le fait qu'une diminution même drastique de la pression de sélection antibiotique ne réduit pas nécessairement la résistance, la principale explication avancée étant l'existence d'un lien génétique entre les intégrons et d'autres marqueurs de résistance.

d. Outils épidémiologiques

Les intégrons peuvent constituer des outils épidémiologiques intéressants. En effet, la diffusion épidémique d'un clone hébergeant un intégron n'est pas rare. La détection de cet élément génétique peut contribuer au suivi de l'épidémie, sans avoir besoin de mettre en œuvre des méthodes génotypiques plus lourdes comme l'électrophorèse en champ pulsé par exemple. Une telle analyse revêt une importance particulièrement grande dans des unités de soins intensifs et de réanimation, permettant alors de mettre en œuvre les mesures thérapeutiques et d'hygiène adéquates. Plusieurs études soulignent l'intérêt des intégrons comme outil épidémiologique, notamment dans les infections à *Acinetobacter* [69, 134].

5. Stabilité des intégrons

Même si l'intégrase IntI est capable *in vitro* d'assurer des réarrangements de cassettes au sein d'un intégron, voire d'en recruter de nouvelles, il n'en reste pas moins que ces propriétés catalytiques ne s'opèrent qu'à de très faibles fréquences [21, 22]. De plus, dans le monde vivant, aucune publication à l'heure actuelle ne rapporte l'acquisition ou le mouvement de cassettes de résistance au sein d'un même intégron suite à une pression de sélection antibiotique. Les transferts latéraux de résistance concernant les intégrons se font *via* la structure génétique mobile qui les héberge à savoir un transposon ou un plasmide : l'intégron est alors transféré en bloc d'une bactérie à une autre dans le cas d'un plasmide, d'un plasmide à un autre ou d'un plasmide à un chromosome dans le cas d'un transposon.

Ce transfert en bloc des intégrons est un argument avancé par plusieurs auteurs. Une étude de 1999 [135] qui a recensé plus d'une vingtaine d'intégrons isolés dans différents hôpitaux européens a constaté une stabilité dans leur agencement en cassettes, et ce quelles que soient les espèces bactériennes hôtes et les origines géographiques. Seules trois régions variables différentes ont été détectées : *aacA4*, *aadA* et *dfr1-aadA*. Qui plus est, ces cassettes étaient toujours associées au même type de promoteurs *Pc*. De même, les travaux récents d'une équipe bordelaise ont montré des organisations en cassettes très communes chez des souches de *Shigella* pourtant d'origines géographiques diverses, et ce aussi bien pour les intégrons de classe 1 que pour ceux de classe 2 [136].

6. La partie immergée de l'iceberg ?

Le lien entre intégrons et résistance crée un biais inévitable de détection des intégrons. Les recherches d'intégrons se concentrent sur des bactéries multirésistantes, mais il ne peut être exclu de mettre en évidence un intégron au sein de bactéries dites sensibles. Il est également à noter que certaines publications recherchent les intégrons de classe 1 en amplifiant par PCR la région variable ; mais cette méthode d'investigation est mauvaise et crée également un biais, étant donné l'absence non négligeable de région 3' parmi les intégrons de classe 1.

Un autre point à souligner est que la plupart des travaux menés aujourd'hui s'intéressent à la recherche d'intégrons directement sur les souches bactériennes. Un premier biais est de ne s'intéresser qu'aux bactéries aérobies à Gram négatif (voire même à une seule espèce bactérienne telle *Escherichia coli*) qui, il est vrai, rassemblent la quasi-totalité des intégrons décrits, mais c'est mettre de côté une immense population bactérienne susceptible d'héberger des intégrons. L'étude de Barlow et collaborateurs en 2004 en est le parfait exemple [114]. Le fait de s'intéresser à la recherche d'intégrons directement à partir d'ADN total extrait de selles de bœufs permet de révéler la présence de bien plus d'intégrons, et notamment dans ce cas précis d'intégrons de classe 2 que ne peut en détecter la seule culture. Pour rappel, dans cette étude, la prévalence sans phase de culture s'élevait à 86 % pour les intégrons de classe 1 *versus* 50 % avec la culture, et 94 % pour ceux de classe 2 *versus* 28 %.

Afin de mieux appréhender la réelle épidémiologie des intégrons de résistance, il semble indispensable aujourd'hui non seulement de s'intéresser à l'ensemble des bactéries cultivables, mais également de disposer de méthodes de détection suffisamment sensibles qui permettent la mise en évidence des intégrons des trois classes au sein d'environnements génétiques plus complexes, en s'affranchissant, dans un premier temps, des méthodes conventionnelles de culture bactérienne.

La PCR en temps réel

II. La PCR en temps réel

A. Rappels sur la PCR classique, dite en point final

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique de biologie moléculaire mise au point il y a 20 ans [137]. Sa découverte a représenté une véritable révolution ; ses applications à l'heure actuelle sont nombreuses et ne se limitent pas au seul domaine de la recherche. Bon nombre de diagnostics médicaux, que ce soit en infectiologie, en hématologie, ou encore en biochimie reposent sur cette méthode d'amplification des séquences nucléiques.

Son principe, relativement simple, est basé sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser un brin complémentaire d'une séquence d'ADN servant de matrice [138]. De courts fragments d'ADN (15-30 bases environ) appelés amorces (ou *primers*) permettent de cibler de façon spécifique la séquence d'intérêt à amplifier, et surtout d'initier le processus. A partir de ces amorces, l'ADN polymérase incorpore les bases élémentaires préalablement rajoutées dans le mélange réactionnel (dNTP) et assure la synthèse du brin complémentaire de la matrice. Au final, un ADN double brin est synthétisé.

La réaction de PCR consiste en une succession de trois étapes répétées de manière cyclique, classiquement 25 à 40 fois, à l'aide d'un thermocycleur [Figures 15, 16] :

- 1) La dénaturation thermique. Elle permet la séparation des deux brins de l'ADN par rupture des liaisons hydrogène. Elle se situe le plus souvent aux alentours de 95°C.
- 2) L'hybridation des amorces. Le milieu réactionnel comporte deux amorces, chacune complémentaire d'un des brins d'ADN. La température choisie, qui varie de 50 à 65°C en général, est inférieure au T_m des amorces. Le T_m correspond au point de fusion des amorces, valeur de température pour laquelle 50 % de l'hybride ADN cible / amorce est sous forme double brin.
- 3) L'élongation. Une ADN polymérase incorpore les désoxyribonucléotides complémentaires au brin matrice. La synthèse s'effectue toujours dans le sens 5'-3'. La température optimale pour la plupart des enzymes est de 72°C et la durée d'élongation est fonction de la taille de la séquence cible à amplifier.

Chaque étape d'un cycle dure le plus souvent entre 30 secondes et 1 minute, soit une durée moyenne de réaction d'environ 2 à 3 heures.

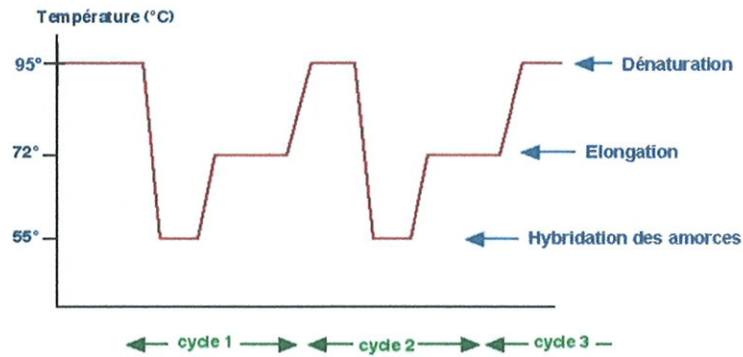


Figure 15 : Cycles de températures effectués durant une PCR.

Chaque cycle est composé de 3 températures : à 95°C, dénaturation des brins d'ADN, puis à 55°C dans cet exemple, hybridation des amorces et enfin à 72°C, élongation des amorces par l'ADN polymérase. Une PCR comprend généralement 25 à 50 cycles.

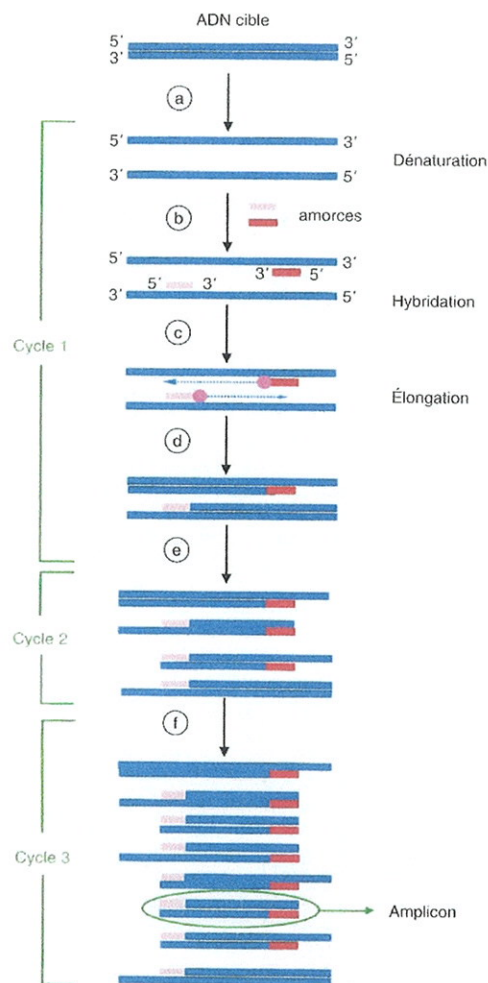


Figure 16 : Principe de la PCR. Produits formés au cours des 3 premiers cycles. D'après [138].

Le cycle 1 montre les 3 étapes fondamentales de la PCR : (a) : dénaturation thermique de l'ADN, (b) : hybridation des amorces à leur cible, (c) : élongation des amorces par l'ADN polymérase dans le sens 5' - 3'.

A la fin du premier cycle (d), obtention de 2 copies de la séquence cible. L'augmentation du nombre de copies est ensuite exponentielle : 4 copies à la fin du cycle 2, puis 8 copies à la fin du cycle 3. Chaque produit amplifié est appelé amplicon.

A chaque cycle, la quantité d'ADN présente est doublée, soit une croissance exponentielle en produits amplifiés. En théorie, pour n cycles, le nombre de copies d'ADN obtenues est 2^n , soit par exemple au bout de 30 cycles, 2^{30} copies, c'est-à-dire plus de 10^9 copies pour 1 copie d'ADN initialement présente. Néanmoins, cette relation entre la quantité de produits amplifiés et le nombre de cycles effectués n'est linéaire que pendant une phase exponentielle. Au-delà, la réaction de PCR « s'affaiblit » (dégradation de la polymérase, épuisement des réactifs, accumulation d'ADN...) et une phase dite de plateau survient [Figure 17].

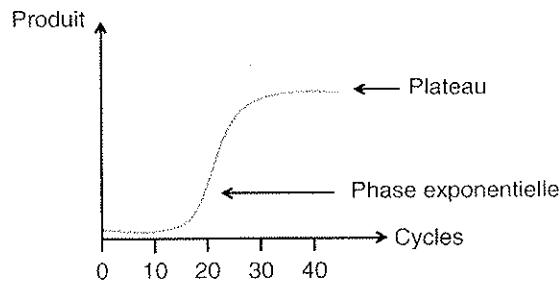


Figure 17 : Cinétique d'une réaction PCR. D'après [138].

La cinétique d'une réaction PCR est composée de 3 phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle où la quantité de produits amplifiés est proportionnelle au cycle d'amplification, puis une phase de plateau. La courbe obtenue a un aspect sigmoïde.

Dans le cas d'une PCR classique, la détection des produits amplifiés, réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose le plus souvent [Figure 18], est une étape supplémentaire indispensable qui doit être effectuée à la fin de la réaction de PCR, c'est-à-dire lorsque les différents produits amplifiés ont atteint la phase de plateau.

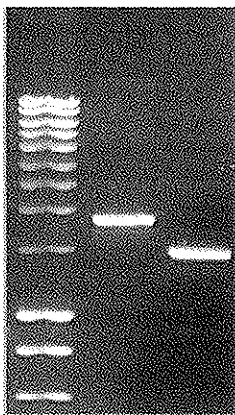


Figure 18 : Electrophorèse sur gel d'agarose de produits de PCR.

Les produits visualisés sur gel d'agarose à l'issue d'une PCR en point final correspondent aux produits présents à la fin de la phase de plateau. Ils sont révélés grâce à la présence d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium le plus souvent. L'intensité du signal n'est pas proportionnelle à la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon. Le seul paramètre accessible est la taille de l'échantillon qui est évaluée grâce au dépôt d'un marqueur de poids moléculaires connus.

Ligne 1 : marqueur de poids moléculaires, lignes 2 et 3 : produits de PCR.

Dans le cas de la PCR en point final, les données lors de la phase exponentielle ne sont pas accessibles. La conséquence directe est qu'il n'est pas possible de quantifier une cible au sein d'un échantillon : cette technique se limite à des données qualitatives.

B. Principe de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel a été mise au point dans les années 1990 ; elle combine la réaction de PCR classique à la détection en temps réel des produits amplifiés. La réaction d'amplification est ainsi suivie pendant toute sa durée, elle ne se limite pas à la phase de plateau [139].

Le principe de la PCR en temps réel est fondé sur la détection des produits amplifiés par un signal fluorescent émis par un fluorophore. L'intensité de celui-ci est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés. L'accès à la quantité de produits formés durant la phase exponentielle rend possible la quantification de l'ADN cible initialement présent dans l'échantillon.

1. Les différentes chimies utilisées

La détection en temps réel des produits amplifiés nécessite la présence d'un fluorophore dont l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité de produits formés. Il existe différents types de fluorophores rassemblés en deux grands groupes : les agents intercalants et les sondes fluorogéniques [140, 141].

a. Les agents intercalants

Un agent intercalant est capable, grâce à sa structure, de s'insérer de manière non spécifique dans la double hélice d'une molécule d'ADN double brin. En PCR en temps réel, l'agent intercalant utilisé est le SYBR® Green I [142, Figure 19].

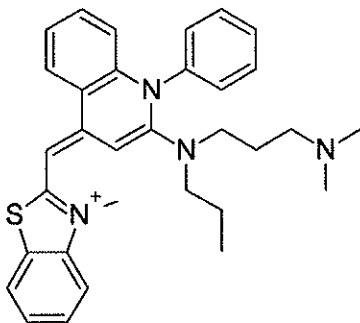


Figure 19 : Structure chimique de la molécule de SYBR® Green I. Cette molécule est un agent intercalant capable de s'incorporer dans la double hélice d'une molécule d'ADN double brin. La structure polyénique aromatique confère des propriétés de fluorescence à la molécule.

A chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle, la molécule de SYBR® Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin. Excitée par des rayonnements lumineux, elle émet alors un signal de fluorescence [Figure 20]. La mesure de l'intensité du signal de fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction de PCR.

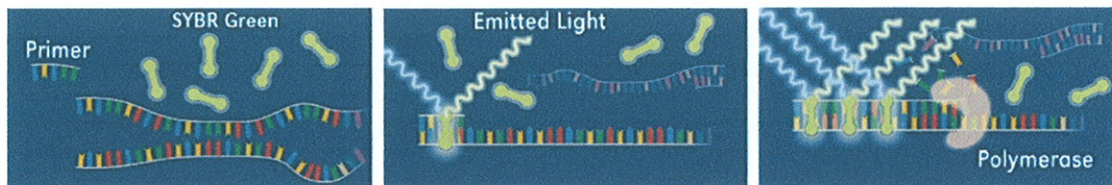


Figure 20 : Mode d'action du SYBR® Green.

La molécule de SYBR® Green I n'est capable de s'incorporer à de l'ADN que lorsque celui-ci est sous forme double brin, c'est-à-dire, lors d'une PCR durant les phases d'hybridation (schéma 2) et d'élongation (schéma 3). La fluorescence émise suite à l'excitation de la molécule par des rayonnements lumineux est proportionnelle à la quantité de SYBR® Green incorporée, c'est-à-dire à la quantité d'ADN présente. En chimie SYBR® Green, le signal de fluorescence est détecté à la fin de la phase d'élongation de chaque cycle.

Ce système de détection est simple et ne nécessite aucune expertise de mise au point particulière. C'est un système très sensible, mais de spécificité limitée. En effet, la molécule de SYBR® Green I s'incorpore dans toute molécule d'ADN double brin, qu'elle soit spécifique ou non de la séquence d'intérêt (amplification parasite, dimères d'amorces). La spécificité de la réaction de PCR repose sur les amorces utilisées. L'établissement d'une courbe de fusion post-PCR permet de vérifier la spécificité de la réaction en déterminant la température de fusion du produit amplifié (température pour laquelle 50 % du produit amplifié est sous forme double brin) [143].

b. Les sondes fluorogéniques

Les sondes fluorogéniques sont des séquences nucléotidiques simple brin, spécifiques du fragment cible amplifié, qui sont marquées à l'une ou l'autre de leur extrémité par un fluorophore. L'emploi de telles sondes n'améliore pas la sensibilité d'une réaction par rapport au SYBR® Green, mais par contre la spécificité est accrue. Plusieurs chimies ont été développées ; les deux plus répandues sont le système TaqMan® constitué d'une seule sonde marquée, et le système FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) qui requiert l'emploi de deux sondes marquées espacées de quelques bases.

- Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman[®]

Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman[®] ou sondes doublement marquées représentent la chimie la plus utilisée en PCR temps réel [144]. Leur succès est notamment lié à leur conception plus aisée que les autres chimies disponibles.

Une sonde Taqman[®] est un oligonucléotide simple brin, linéaire, marqué à ses extrémités 5' et 3' par deux fluorophores. Classiquement, le fluorophore greffé en 5' est appelé fluorophore donneur, émetteur ou *reporter* (par exemple FAM qui est un dérivé de la fluorescéine) ; celui greffé en 3' est appelé fluorophore extincteur ou *quencher* (par exemple TAMRA qui est un dérivé de la rhodamine). La séquence d'une sonde étant courte, 20 à 30 nucléotides en moyenne, les deux fluorophores sont séparés de seulement quelques dizaines d'angströms. Dans ces conditions, l'excitation du fluorophore donneur par un rayonnement lumineux conduit à l'émission d'une fluorescence de longueur d'onde plus élevée, dont l'énergie est absorbée par le fluorophore extincteur présent en 3'. Autrement dit, lorsque le *reporter* d'une sonde native est excité, il n'émet aucun signal de fluorescence [Figure 21].

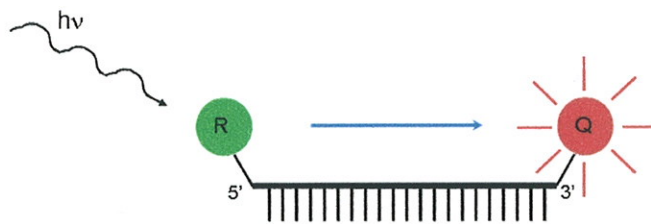


Figure 21 : Représentation schématique d'une sonde native Taqman[®].

Une sonde Taqman[®] est un oligonucléotide marqué en 5' par un fluorophore émetteur (ou *reporter*, représenté en vert) et en 3' par un fluorophore extincteur (ou *quencher*, représenté en rouge). Lorsque le fluorophore émetteur est excité par un rayonnement ($h\nu$), la fluorescence réémise est absorbée (flèche bleue) par le quencher situé en 3'. Aucun signal de fluorescence n'est détecté. R : *reporter*, Q : *quencher*.

Les sondes Taqman[®] tirent partie de l'activité 5'-3' exonucléasique de l'ADN polymérase utilisée. Lors de la phase d'élongation, l'ADN polymérase rencontre la sonde préalablement hybridée à sa séquence spécifique. Grâce à son activité exonucléasique, elle est capable de cliver la sonde, séparant ainsi le *reporter* du *quencher* [Figure 22]. A ce stade, la fluorescence émise par le *reporter* n'est plus absorbée par le *quencher* du fait de l'éloignement de ce dernier. Dans le cas d'une chimie Taqman[®], la lecture de la fluorescence s'effectue à la fin de la phase d'élongation de chaque cycle, lorsque toutes les sondes hybridées ont été hydrolysées. Le signal lumineux mesuré est directement proportionnel à la quantité de sondes hydrolysées, soit au nombre de copies d'ADN cible amplifiées.

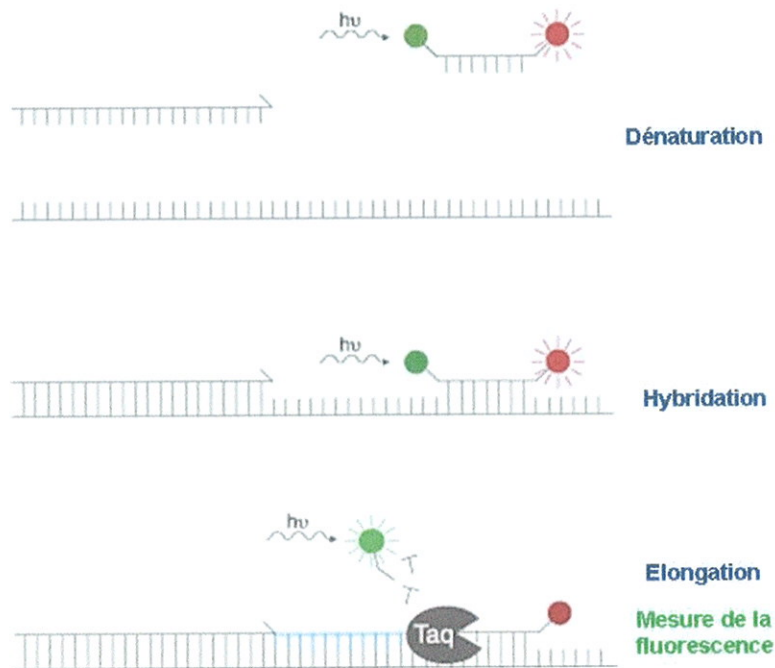


Figure 22 : Principe de la chimie Taqman[®] en PCR en temps réel.

Lors des étapes de dénaturation et d'hybridation, la sonde Taqman[®] est sous sa forme native. Une éventuelle excitation lumineuse du *reporter* ne générerait aucune fluorescence, du fait de l'absorption de cette dernière par le *quencher*. Lors de l'élongation, l'ADN polymérase grâce à son activité 5'-3' exonucléasique hydrolyse la sonde, séparant ainsi le *reporter* du *quencher*. En cas d'excitation du *reporter*, la fluorescence émise est mesurable : elle est proportionnelle à la quantité de sonde hydrolysée et donc d'ADN cible amplifié. Sa mesure s'effectue en fin de phase d'élongation.

Afin que ce système fonctionne, la condition *sine qua non* est que la sonde se soit hybridée avant que l'élongation ne s'opère. Pour se faire, il est nécessaire que le T_m de la sonde soit supérieur d'environ 10°C à celui des amorces et il est de plus préférable d'utiliser des conditions d'amplification particulières avec des cycles en 2 étapes : après l'étape de dénaturation, une même température rassemble les phases d'hybridation et d'élongation. Classiquement, un programme de PCR temps réel en chimie Taqman[®] comprend une quarantaine de cycles avec une étape de dénaturation vers 94-95°C et une étape d'hybridation-élongation aux alentours de 60°C.

Par ailleurs, certaines exigences sont nécessaires quant à la synthèse des sondes Taqman[®] : la taille (20 à 40 bases), le contenu en GC (40-50 %), l'absence de séquences répétées, l'absence de séquences chevauchantes avec les amorces, l'absence d'une base G en 5' qui a un effet *quencher*, un T_m supérieur de 6-10°C à celui des amorces sont autant de paramètres à prendre en compte qui contribuent à l'optimisation de la réaction de PCR. De plus, idéalement, le produit d'amplification doit être d'une taille inférieure à 150 paires de bases en raison de la moindre activité d'élongation de la polymérase à 60°C. Ces différentes

règles ne sont pas toujours applicables car dictées par la séquence du fragment à amplifier : il faut alors réaliser des compromis.

Les sondes Taqman[®]-MGB ont été développées récemment [145]. Le MGB (*minor groove binder*) est une molécule accrochée au *quencher* en 3' qui est capable de s'insérer dans le petit sillon de la double hélice d'ADN formée par la sonde et la séquence cible. Cette structure moléculaire augmente le T_m de la sonde, ce qui permet de synthétiser des sondes plus courtes et plus faciles à concevoir (12-20 bases). De plus, la spécificité de la réaction est augmentée.

- Le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*)

Développé par la société Roche[®], le système FRET [146] est également basé sur le principe du couple *reporter* / *quencher*, mais son application est quelque peu différente. Il repose sur l'emploi d'un couple de sondes d'hybridation courtes portant chacune un fluorophore. Celles-ci s'hybrident à la séquence cible de telle sorte que l'espacement entre les deux sondes est limité à 1 à 5 bases. La première sonde porte à son extrémité 3' un fluorophore *reporter*, la seconde un fluorophore *quencher* en 5' [Figure 23].

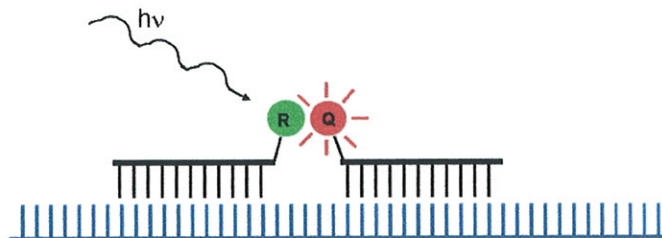


Figure 23 : La technologie FRET.

Dans la technologie FRET, deux sondes simplement marquées sont spécifiques de la séquence amplifiée : l'une des sondes porte un *reporter* en 3', l'autre un *quencher* en 5'. La mise au point est telle que l'espacement entre les deux sondes, lorsqu'elles sont hybridées à la séquence cible (en bleu), est limité à moins de 5 bases. Dans ces conditions la fluorescence émise par le *reporter* excité est absorbée par le *quencher*.

Deux technologies sont applicables : soit le spectre d'émission du *reporter* chevauche le spectre d'excitation du *quencher*, auquel cas, un signal de fluorescence sera mesuré (*FRET classique* [Figure 24]) ; soit la fluorescence émise par le *reporter* est absorbée par le *quencher*, auquel cas c'est la perte de fluorescence qui est mesurée (*quenched FRET*). Dans les deux cas, la mesure du signal de fluorescence est faite lors de l'étape d'hybridation. L'une ou l'autre des technologies est applicable, elle dépend de l'appareil utilisé.

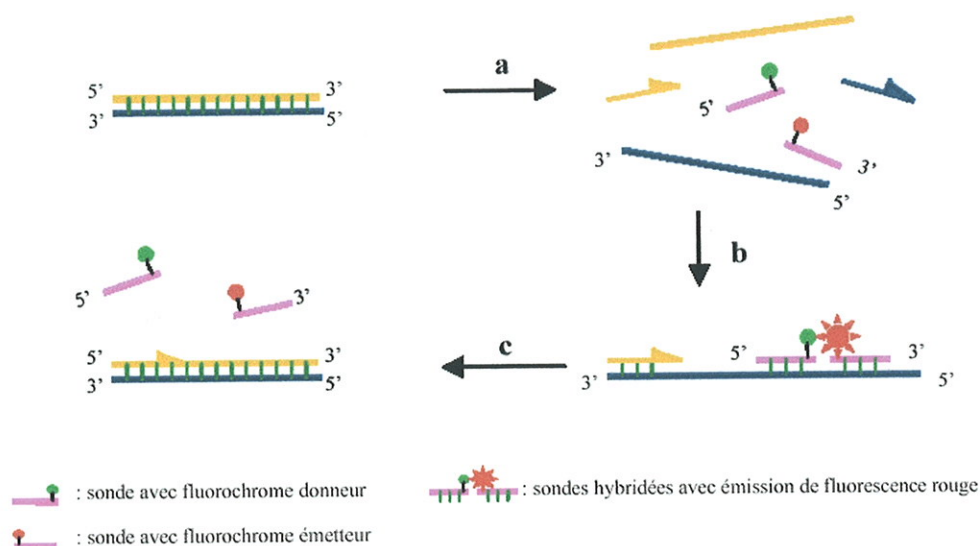


Figure 24 : Principe de la chimie FRET en PCR en temps réel (FRET classique). D'après [141].

- Lors de l'étape de dénaturation, les sondes sont à l'état libre dans le milieu réactionnel.
- Au moment de l'hybridation, les deux sondes se fixent à leur cible et se retrouvent côte à côte. Leur proximité permet le transfert de l'énergie du fluorophore donneur vers le fluorophore accepteur, d'où un transfert d'énergie et une émission de fluorescence par le *quencher*.
- Lors de l'élongation, les deux sondes sont libérées dans le milieu réactionnel. Il n'y a plus de signal de fluorescence émis par le *quencher*.

Quelle que soit la technologie employée (FRET classique ou *quenched* FRET), la chimie FRET ne conduit pas à une hydrolyse des sondes. Il est donc possible, à l'image du SYBR[®] Green, de réaliser en post-PCR l'établissement d'une courbe de fusion. Cette chimie est très sensible mais son utilisation est plus limitée : outre un coût plus élevé que les sondes Taqman[®], leur conception est plus délicate.

- Les balises moléculaires (*molecular beacons*)

Les balises moléculaires ou *molecular beacons* sont de conception plus récente [147]. Il s'agit de sondes dont la structure est en forme d'épingle à cheveu : est associé à une boucle simple brin spécifique de l'ADN cible, un tronc ou queue double brin dont chaque extrémité est marquée par un *reporter* et un *quencher* [Figure 25]. Sous cette configuration, la proximité des deux fluorophores fait qu'aucun signal de fluorescence émis par le *reporter* n'est détectable : l'énergie émise est absorbée par le *quencher*.

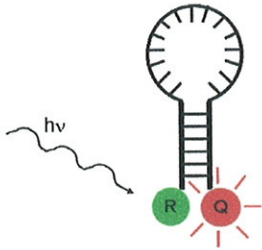


Figure 25 : Balise moléculaire (*molecular beacon*).

La boucle est une séquence simple brin qui correspond à la partie spécifique de l'ADN cible. Le tronc est une séquence double brin arbitraire : à chacune des deux extrémités, se trouvent un *reporter* et un *quencher*. Sous cette configuration, l'énergie émise par le *reporter* excitée est absorbée par le *quencher*. Aucun signal de fluorescence n'est détecté. R : *reporter*, Q : *quencher*.

A la température d'hybridation de la sonde, les conditions thermodynamiques deviennent favorables à l'ouverture de la balise moléculaire : celle-ci prend une forme linéaire plus stable et s'hybride à sa cible. A ce stade, la fluorescence émise par le *reporter* n'est plus absorbée par le *quencher* : elle devient mesurable [Figure 26].

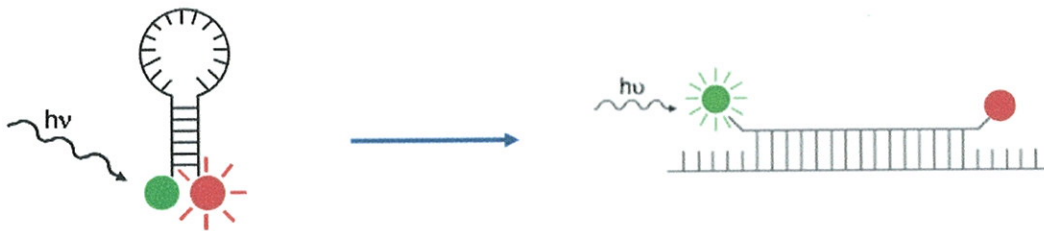


Figure 26 : Principe de la chimie balise moléculaire (*molecular beacon*).

Lors de l'hybridation de la sonde à sa cible, la balise moléculaire change de conformation spatiale et se linéarise. L'excitation lumineuse du *reporter* génère une fluorescence dont l'énergie n'est plus absorbée par le *quencher*, du fait de son éloignement spatial. Un signal de fluorescence est alors quantifiable.

Les balises moléculaires permettent d'obtenir une très grande spécificité : la variation d'un seul nucléotide sur la séquence cible empêche l'hybridation de la sonde. L'inconvénient majeur de ces sondes réside dans leur coût de synthèse, mais aussi dans leur difficulté de conception.

- Autres chimies

D'autres systèmes très ingénieux ont été développés comme par exemple les sondes Scorpions[®] [148], mais leurs utilisations restent rares, liées notamment à leur difficulté de mise au point et à leur coût plus élevé.

2. Sondes fluorogéniques et multiplexage

L'emploi d'agents intercalants, tels que le SYBR[®] Green, limite généralement la réaction de PCR en temps réel à la détection et la quantification d'une seule cible. Au contraire, les sondes fluorogéniques permettent de détecter et de quantifier des gènes différents dans un même milieu réactionnel ; cette possibilité de PCR multiplex réside dans le marquage de chacune des sondes cibles par des fluorophores différents. Travailler en PCR en temps réel multiplex présente l'avantage évident de limiter le nombre de réactions d'échantillonnage, de s'affranchir également de problèmes de pipetage, mais les mises au point sont plus complexes car soumises à de nombreuses contraintes physiques et chimiques.

Les contraintes physiques sont de deux ordres : disposer de fluorophores dont les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont bien distincts, et deuxième condition qui est liée, disposer de systèmes optiques adaptés capables de focaliser finement à la fois la longueur d'onde de la lumière excitatrice, mais aussi celle de la lumière fluorescente réémise. A l'heure actuelle, ces contraintes physiques sont mieux maîtrisées, grâce à la synthèse de nouveaux fluorophores dont les spectres sont plus resserrés et séparés entre eux [Figure 27], et grâce à des appareils plus performants dont les systèmes optiques sont capables de focaliser les lumières excitatrices et émettrices avec une bande passante la plus étroite possible.

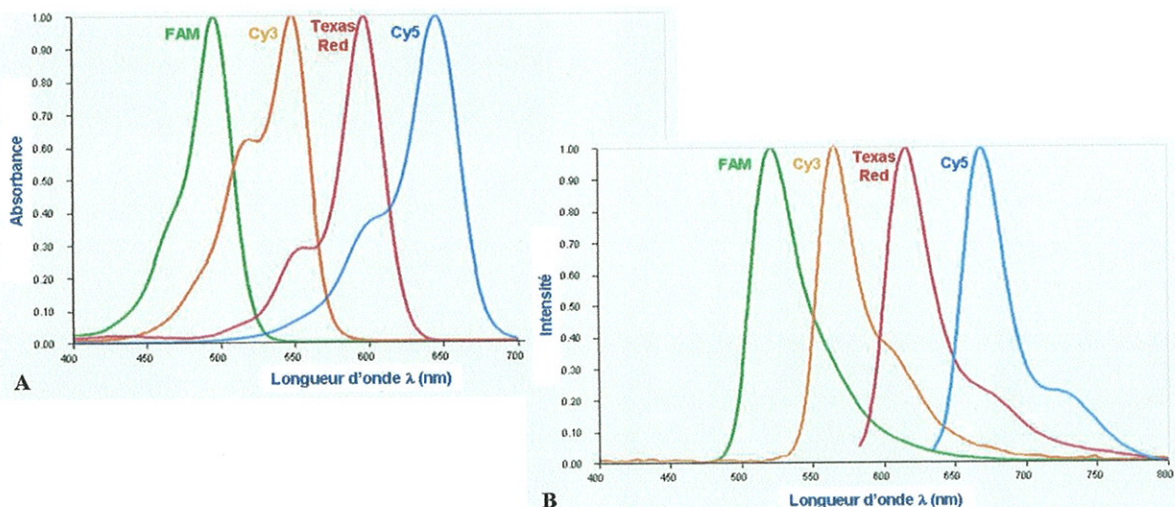


Figure 27 : Exemples de spectres d'absorption (A) et d'émission (B) de 4 fluorophores utilisés en PCR temps réel : FAM, Cy3, Texas Red et Cy5.

FAM est un dérivé de la fluorescéine dont le spectre est comparable à celui du SYBR[®] Green. Afin de visualiser correctement l'hybridation d'une sonde marquée par FAM, le milieu réactionnel doit être éclairé par une lumière de longueur d'onde voisine de 495 nm et la lecture de la fluorescence réémise doit se faire en focalisant la longueur d'onde vers 519 nm. De même, pour les autres fluorophores présentés sur ce schéma : Cy3 (550 – 570 nm), Texas Red (589 – 610 nm), Cy5 (649 – 670 nm). Il est important de disposer de filtres efficaces afin d'obtenir les bandes passantes les plus étroites possibles.

La mise sur le marché des *dark quenchers* tels que le DABCYL [149] ou les *black hole quenchers* (BHQ[®]) a grandement contribué à l'amélioration du système de multiplexage : à l'inverse des anciens *quenchers*, comme le TAMRA, qui réémettait une partie de la lumière absorbée, les *dark quenchers* absorbent l'énergie transmise par le *reporter* et la restituent sous forme de chaleur, sans émission de fluorescence parasite. Ces différentes améliorations font qu'il est possible aujourd'hui de distinguer jusqu'à quatre, voire cinq signaux de fluorescence différents.

Les contraintes chimiques restent plus difficiles à solutionner car liées à l'expérimentation que l'on souhaite réaliser. Pour chaque cible à amplifier, deux amorces et une sonde sont nécessaires, soit par exemple pour la mise au point d'une PCR triplex trois couples d'amorces et trois sondes, soit un total de neuf oligonucléotides différents. La conception des différents couples d'amorces et sondes est grandement compliquée car il faut tenir compte au mieux des éventuelles hybridations entre tous ces oligonucléotides, tout en conservant le plus possible les règles de conception des couples d'amorces et des sondes. Par ailleurs, les risques de compétition sont augmentés, risquant d'affecter l'efficacité d'amplification de chacune des réactions de PCR. Ce phénomène est particulièrement vrai lorsqu'une des cibles est en très forte concentration par rapport aux autres, la réaction la concernant ayant tendance à consommer plus de réactifs (MgCl₂, dNTP...).

3. Considérations mathématiques

L'application première de la PCR en temps réel est de déterminer la quantité initiale (Q_0) d'un ADN cible présent dans un échantillon. Or, la seule possibilité offerte par un appareil de PCR en temps réel est de mesurer à l'issue de chaque cycle (n) une intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité cumulée d'ADN amplifié (Q_n). Il est donc nécessaire d'établir une relation entre Q_0 et Q_n de façon à déterminer la valeur d'intérêt Q_0 .

Théoriquement, durant la phase exponentielle, après chaque cycle de PCR, la quantité d'ADN présente dans le milieu réactionnel est doublée :

$$\text{A la fin du premier cycle : } Q_1 = 2 \times Q_0$$

$$\text{A la fin du deuxième cycle : } Q_2 = 2 \times Q_1 = 2 \times (2 \times Q_0) = 2^2 \times Q_0$$

$$\text{Et ainsi de suite } Q_3 = 2 \times Q_2 = 2 \times (2^2 \times Q_0) = 2^3 \times Q_0$$

Au final, la relation entre Q_n et Q_0 est la suivante : $Q_n = Q_0 \times 2^n$.

a. Notion d'efficacité

La relation précédente n'est vraie que si, à chaque cycle de PCR, la quantité d'ADN est doublée. Dans ce cas-là, l'efficacité (E) de la réaction de PCR est de 100 %, soit égale à 1. En pratique, cette règle n'est que rarement vraie, et si l'on souhaite connaître la valeur de Q_0 , il est indispensable d'intégrer dans l'équation l'efficacité de la réaction.

L'efficacité E est définie comme le rapport entre la quantité de molécules synthétisées à la fin d'un cycle ($Q_{n+1}-Q_n$) et la quantité de molécules présentes au début du même cycle (Q_n), soit :

$$E = (Q_{n+1}-Q_n) / Q_n \text{ ou encore } Q_{n+1} = Q_n \times (1+E)$$

En intégrant Q_0 :

$$Q_1 = Q_0 \times (1+E)$$

$$\text{puis } Q_2 = Q_1 \times (1+E) = Q_0 \times (1+E) \times (1+E) = Q_0 \times (1+E)^2$$

$$\text{et ainsi de suite } Q_3 = Q_2 \times (1+E) = Q_0 \times (1+E)^3$$

Au final, en intégrant la notion d'efficacité, la relation entre Q_n et Q_0 est : $Q_n = Q_0 \times (1+E)^n$.

Cette relation n'est valable que dans la zone exponentielle d'amplification.

La valeur de Q_n n'est pas directement accessible. En effet, l'appareil mesure seulement une émission de fluorescence à l'issue du cycle n. Afin d'établir la relation entre Q_n et l'intensité de fluorescence, il est nécessaire de disposer d'une gamme témoin comprenant des quantités connues d'ADN cible. Généralement, l'ADN cible est cloné dans un plasmide ; après extraction de ce dernier et mesure de sa concentration, des dilutions successives permettent d'établir une gamme. Le plus souvent, des dilutions de 10 en 10 sont réalisées.

b. Notion de seuil (t) et de cycle seuil (C_t)

Dans les premiers cycles d'une PCR, le signal fluorescent est trop faible pour être détecté par l'appareil. Au bout d'un certain nombre de cycles, fonction de la quantité d'échantillon présente, une augmentation significative du signal fluorescent apparaît. Ce signal, déterminé par le logiciel ou l'opérateur lui-même, est appelé seuil ou *threshold* (t). Il est fixé de façon à pouvoir distinguer du bruit de fond un signal fluorescent lié à une

amplification des produits PCR. Ce seuil se situe dans la phase exponentielle de la réaction de PCR. Son intersection avec la courbe d'acquisition de fluorescence (intensité de fluorescence = $f(\text{cycles})$) permet de déterminer un cycle seuil appelé C_t [Figure 28].

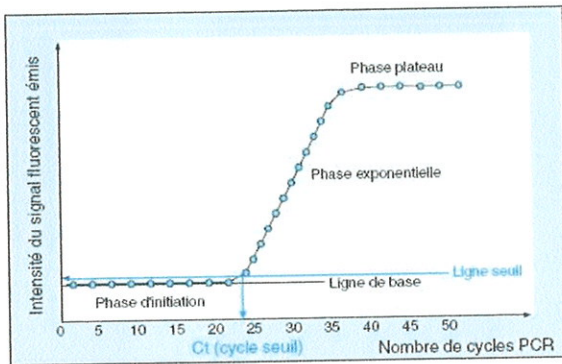


Figure 28 : Suivi en temps réel d'une réaction PCR. Chaque point bleu de la courbe correspond à la mesure du signal de fluorescence à la fin de chaque cycle. La ligne de base reflète le bruit de fond. La ligne seuil correspond à une détection significative de la fluorescence. Le point d'intersection de la courbe cinétique avec le seuil détermine un cycle seuil C_t qui est directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon.

La valeur du C_t est inversement proportionnelle au logarithme de la quantité d'ADN présente dans le milieu réactionnel : plus les échantillons sont fortement concentrés en ADN cible, plus leurs C_t sont précoces, et inversement.

c. Equation de la droite $C_t = f(Q_0)$

Grâce au passage d'une gamme témoin, il est possible d'établir une droite exprimant les C_t en fonction des différentes concentrations en ADN. Avec l'équation de cette droite, la quantité Q_0 d'un échantillon inconnu peut être déterminée.

Fixer la valeur du seuil t revient dans l'équation précédente $Q_n = Q_0 \times (1+E)^n$ à transposer Q_n en unité de fluorescence.

$$\text{D'où : } t = Q_0 \times (1+E)^{C_t}$$

$$\text{soit } \log(t) = \log(Q_0 \times (1+E)^{C_t}) = \log(Q_0) + \log(1+E)^{C_t} = \log(Q_0) + C_t \times \log(1+E)$$

Après réarrangement des équations, l'équation de la droite [Figure 29] est :

$$C_t = [-\log(Q_0) / \log(1+E)] + [\log(t) / \log(1+E)]$$

avec $y = C_t$

$$a \text{ (pente)} = -1 / \log(1+E)$$

$$x = \log(Q_0)$$

$$b \text{ (ordonnée à l'origine)} = \log(t) / \log(1+E)$$

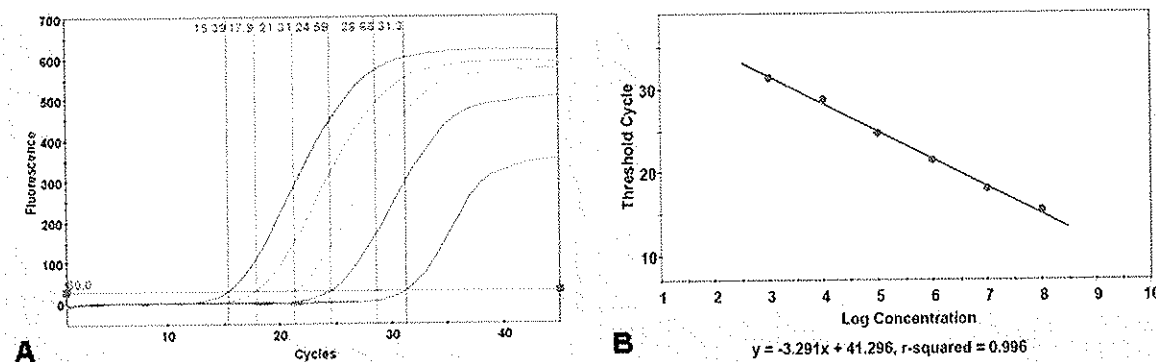


Figure 29 : Exemple de résultats obtenus à l'issue d'une expérimentation de PCR en temps réel.

A. Une gamme d'un gène cible s'étendant de 10^8 à 10^3 copies a été soumise à une réaction de PCR en temps réel. Après fixation du seuil (ligne rouge horizontale), correspond pour chaque point de gamme un cycle seuil C_t (lignes rouges verticales).

B. Le report des C_t en fonction du logarithme de la concentration des points de gamme permet de tracer une droite et de poser son équation. Sa pente permet de calculer l'efficacité (dans cet exemple, -3,291, soit 101 %), l'ordonnée à l'origine correspond au C_t d'une seule copie du gène cible. Le coefficient de corrélation (*r-squared*) établit la dispersion des points par rapport à la droite. Idéalement, sa valeur doit être de 1.

Cette expérimentation a été réalisée sur l'appareil SmartCycler® II.

Le calcul de la pente (a) de la courbe est fondamental car il donne accès à l'efficacité de la réaction de PCR : $E = -1 + 10^{(-1/a)}$; quand E est égal à 1, soit une efficacité de 100 %, la pente de la droite est de -3,32. Une très faible augmentation de la pente conduit à une baisse de l'efficacité : -3,6 par exemple correspond à une efficacité de 90 %. Il n'existe pas de véritable règle concernant une valeur minimale d'efficacité, néanmoins, une efficacité d'au moins 90 % est recommandée. Plus l'efficacité est proche de 100 %, plus la réaction de PCR est considérée comme robuste. Un paramètre à retenir est que pour une efficacité de 100 %, deux points qui diffèrent d'un rapport de concentration de 1 à 10 sont séparés de 3,32 cycles.

L'ordonnée à l'origine (b) est un autre paramètre intéressant ; elle donne le C_t qui correspond à la détection d'une copie de l'ADN cible ($\log(Q_0) = 0$, soit $Q_0 = 1$). Le C_t d'un échantillon, supérieur à cette valeur, n'a mathématiquement pas de sens.

d. Quantification

In fine, l'établissement de l'équation de la droite permet facilement de connaître la quantité d'ADN présente dans un échantillon inconnu. Il suffit tout simplement de reporter sa valeur de C_t sur la courbe $C_t = f(\log Q_0)$ et de déterminer alors Q_0 [Figure 30]. A noter que dans le cas d'une réaction multiplex, il est très difficile d'être quantitatif du fait des réactions de compétition quasiment inévitables entre les différentes amorces et sondes présentes.

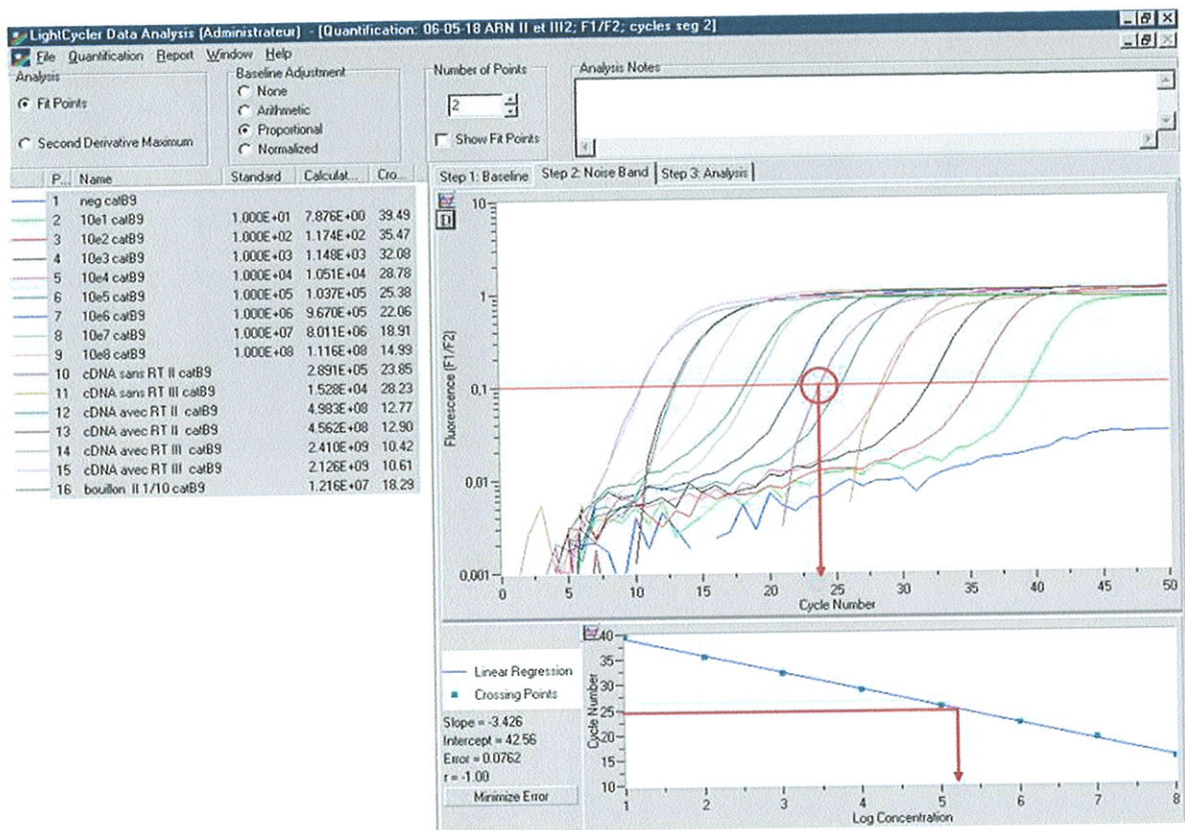


Figure 30 : Exemple de résultats obtenus à l'issue d'une expérimentation de PCR en temps réel.
 Le seuil (ligne rouge) permet de déterminer les Ct des différents échantillons. A chaque point de gamme (10^8 à 10^1 copies) du gène testé (*catB9* dans cet exemple) correspond une valeur de C_t . La droite bleue $C_t=f(\log [catB9])$ est tracée par le logiciel. Le C_t des échantillons, reporté sur la courbe (flèche rouge) permet alors de connaître leurs concentrations en ADN cible. Cette expérimentation a été réalisée sur l'appareil LightCycler®.

C. Avantages de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel présente de multiples avantages par rapport à la PCR en point final [Tableau 3] : sa sensibilité est accrue ; sa spécificité est augmentée lorsque sont utilisées des sondes fluorogéniques. La durée du rendu de résultat est plus courte : les programmes d'amplification sont plus rapides et aucune manipulation en post-PCR n'est nécessaire, ce qui réduit non seulement les temps de manipulation, mais aussi les risques de contamination. Travailler avec des sondes permet de plus de s'affranchir des risques cancérogènes des agents intercalants. La PCR en temps réel, et c'est son application première, permet de quantifier l'ADN cible au sein d'échantillons inconnus de façon beaucoup plus reproductible et précise que la PCR en point final qui se limite à du semi-quantitatif. Enfin, elle offre une grande capacité de multiplexage et vu sa rapidité, une grande capacité d'échantillonnage.

Comparaison de la PCR en temps réel versus PCR « classique »		
	PCR en temps réel	PCR classique
Rapidité	Très rapide : nécessite 30-60 min pour amplifier 25-30 cycles	Moins rapide : nécessite 1-2 h pour amplifier 25-30 cycles
Reproductibilité	Excellente	Bonne
Sensibilité	Bonne, idem PCR classique	Bonne, idem PCR en temps réel
Spécificité	Bonne, idem PCR classique	Bonne, idem PCR en temps réel
Détection des produits amplifiés	Détection rapide : la détection et l'amplification sont réalisées en une seule étape. Les deux étapes sont réalisées en 2 h, au maximum	Très longue : la détection est l'amplification sont réalisées en deux étapes qui nécessitent 24 à 72 h
Possibilité de multiplexage	Oui. La PCR en temps réel possède une grande capacité de multiplexage : <ul style="list-style-type: none"> • une à plusieurs mutations ou agents pathogènes peuvent être mis en évidence dans 1 seul tube ; • amplification et détection simultanées 	Possible, mais : <ul style="list-style-type: none"> • la mise au point est difficile ; • nécessite différents marquages et/ou enzymes pour différencier les produits amplifiés ; • technique lourde
Les risques de contamination	Les automates de PCR en temps réel ont l'avantage d'être un système fermé. Par conséquent, les risques de contamination sont réduits	Risques élevés
Possibilité de courbes de fusion	Certains appareils de PCR en temps réel permettent de réaliser une courbe de fusion grâce à l'utilisation des sondes telles que les balises moléculaires, sonde FRET. Ceci permet : <ul style="list-style-type: none"> • la détection de mutation éventuelle de la cible amplifiée ; • de mettre en évidence plusieurs agents pathogènes dans le même tube ; • la détection de une à plusieurs mutations dans le même tube 	Non
Possibilité de quantification du produit amplifié	La PCR en temps réel permet la détection et la quantification de la cible dans un échantillon. Grâce au Ct (cycle seuil) qui est inversement proportionnel à la quantité de la cible présente dans l'échantillon : <ul style="list-style-type: none"> • un Ct précoce correspond à une concentration élevée de la cible avant l'amplification ; • un Ct élevé correspond à une concentration faible dans l'échantillon avant l'amplification 	Non
Coût	Les appareils de PCR en temps réel sont relativement chers. Cependant, leur capacité de multiplexage permet la mise en évidence de une à plusieurs mutations ou agents pathogènes dans le même tube ce qui réduit considérablement le prix par analyse. De plus, l'absence d'étape de post-PCR permet de réduire les coûts du matériel nécessaire à la détection des produits amplifiés. Enfin, le coût en temps de main-d'œuvre est considérablement réduit	Les thermocycleurs utilisés en PCR classique sont relativement peu chers. Cependant, la PCR classique nécessite une étape de détection (enzymes, marquages radioactifs, hybridation). La PCR, classique, en raison de sa durée d'exécution longue, ne permet aucun gain de temps de main-d'œuvre

Tableau 3 : Comparaison de la PCR en temps réel et de la PCR en point final. D'après [138].

Son principal écueil reste aujourd'hui son coût lié à l'achat de l'appareil, des consommables, des réactifs et des sondes. Mais, pris dans son ensemble (moins temps de manipulation, moins temps de main d'œuvre, économie de matériel utilisé en post-PCR...), il reste modéré. Pour toutes ces raisons, cette technologie devient de plus en plus accessible et tend à supplanter la PCR en point final. A terme, la PCR en temps réel devrait s'imposer sur le marché.

D. Appareils de PCR en temps réel

Les appareils de PCR en temps réel combinent un thermocycleur et un fluorimètre. Les principales différences d'un appareil à l'autre résident dans leur capacité d'échantillonnage et dans leur système optique d'émission (laser, diode électroluminescente ou lampe halogène) et de détection du signal lumineux. Seuls les appareils les plus récents permettent de réaliser du multiplexage (4, voire 5 canaux).

Au final, chaque appareil dispose de ses caractéristiques techniques propres avec ses avantages et inconvénients respectifs. Le choix d'un appareil de PCR en temps réel dépend bien entendu de ses caractéristiques techniques, mais il réside aussi dans l'utilisation que l'opérateur souhaite en faire. Dans un contexte d'urgence diagnostique par exemple, le choix d'un appareil comme le SmartCycler® II qui dispose de blocs indépendants s'impose ; au contraire, une utilisation plus routinière avec un objectif de quantification s'orientera plutôt vers un appareil comme le LightCycler®. Enfin, dans le cas d'une utilisation intensive, mieux vaut préférer un appareil à grande capacité qui permet de travailler en plaque de 96 puits [Figure 31].



Figure 31 : Exemple de 3 appareils de PCR en temps réel.

Photo 1 : SmartCycler® II (Cepheid®). Cet appareil est dédié à des diagnostics d'urgence. Il est composé de blocs indépendants qui permettent de lancer des recherches d'ADN cibles différents ayant des programmes d'amplification différents.

Photo 2 : LightCycler® (Roche®). Cet appareil est l'un des premiers à avoir été mis au point. Il permet de passer sur une même série une trentaine d'échantillons.

Photo 3 : MX3005P® (Stratagene®). Il s'agit d'un appareil de grande capacité qui permet de travailler en plaques de 96 puits.

E. Applications de la PCR en temps réel

Grâce notamment à sa grande rapidité et ses capacités de quantification, la PCR en temps réel trouve des applications dans tous les domaines de la biologie médicale (microbiologie, hématologie, oncologie, immunologie...), mais aussi environnementale [138].

La microbiologie est assurément l'un des domaines où la PCR en temps réel s'est le plus développée [150].

La virologie a très tôt bénéficié des capacités de quantification de la PCR en temps réel [151]. La quantification des virus dans différents liquides biologiques, comme par exemple le sang, est d'un intérêt évident pour le suivi des patients infectés. De nombreux articles emploient la technique de PCR en temps réel pour la quantification des virus du SIDA [152], des hépatites B et C [153]. Cette technologie est désormais appliquée en routine dans le suivi thérapeutique de patients infectés. De plus, des travaux mettent à profit les capacités de multiplexage de la PCR en temps réel [154, 155]. En bactériologie, la PCR en temps réel est également largement utilisée : détection de certaines bactéries non cultivables (*Tropheryma whippelii* [156]), détection de gènes ou de mutations de résistance [157]. La recherche rapide du gène *mecA* responsable de la résistance des staphylocoques aux β -lactamines est d'un intérêt majeur pour les cliniciens, sa présence conditionnant un changement dans l'antibiothérapie instaurée. Grâce à la PCR en temps réel, il est désormais possible de détecter le gène *mecA* sur une souche, voire directement à partir d'un prélèvement, et d'en informer le clinicien en quelques heures, d'où un intérêt évident pour le patient [158]. De même, la recherche des principaux germes responsables de méningites revêt un intérêt fondamental dans la prise en charge urgente des patients [159] : la PCR en temps réel apporte un diagnostic beaucoup plus rapide et plus sensible qu'une culture bactérienne classique ; elle revêt un intérêt majeur dans les cas de méningites décapitées. Il est également possible *via* la PCR en temps réel de connaître en quelques heures seulement le sérotype de méningocoque responsable d'une méningite, et de déclencher au besoin une prophylaxie vaccinale dans l'entourage du malade [160].

Une autre application de la PCR en temps réel en biologie est la quantification des transcrits. Par exemple, la quantification des transcrits de l'oncogène *bcr-abl* est utilisée chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique dans le suivi de leur traitement et la détection d'une maladie résiduelle [161].

Introduction à l'étude expérimentale

PCR en temps réel et intégrons

Objectifs

Depuis la découverte des intégrons, des dizaines de couples d'amorces ont été décrits et employés pour la détection des intégrons de classe 1, 2 et 3 par PCR en point final. Cette multiplicité des couples d'amorces reflète l'absence de consensus dans le choix de la détection des intégrons de résistance, mais aussi les difficultés rencontrées par les chercheurs pour disposer d'un outil fiable. Une étude très intéressante en 2005 s'est attachée à répertorier les couples d'amorces décrits par plusieurs auteurs afin de choisir les couples les plus spécifiques en vue d'une PCR multiplex en point final [162]. Il ressort de cette étude que même dans des conditions de PCR simplex, certains couples d'amorces conduisent à des amplifications non spécifiques : par exemple, certains couples utilisés pour l'amplification du gène *intI1* amplifient également des fragments non spécifiques avec les gènes *intI2* et *intI3*, d'autres amplifient le gène *intI3* avec la même taille de fragment. De même, certains couples utilisés pour la détection du gène *intI2* amplifient un fragment du gène *intI3* de taille équivalente. Les auteurs ont de plus montré lors de PCR multiplex la possibilité chez certaines espèces bactériennes dépourvues d'intégrons, d'amplifications parasites dont les tailles peuvent parfois correspondre à celle attendue d'un fragment d'intégrase.

Des travaux réalisés au sein du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges, visant également à mettre au point une réaction de PCR multiplex en point final pour la détection simultanée des trois classes d'intégrons, ont conduit à des conclusions similaires : non seulement il a été très difficile de valider la technique sur des souches (bandes parasites), mais lorsqu'il a fallu la transposer à un extrait d'ADN polybactérien, les résultats devenaient ininterprétables.

Un des éléments permettant d'expliquer toutes ces réactions non spécifiques repose sur la très grande homologie des gènes des intégrases, non seulement avec d'autres gènes de la famille des tyrosines à recombinaison, mais aussi entre eux. Un alignement des séquences nucléotidiques des trois intégrases de résistance révèle de fortes identités, notamment entre les gènes *intI1* et *intI3* [Figure 32]. De plus, certaines séquences se retrouvent répétées sur 6, 7, voire 8 bases en plusieurs positions des gènes. Dans de telles conditions, le choix de couples d'amorces les plus performants pour l'amplification de chacune des intégrases est délicat, et il devient quasiment inévitable d'obtenir des amplifications non spécifiques.

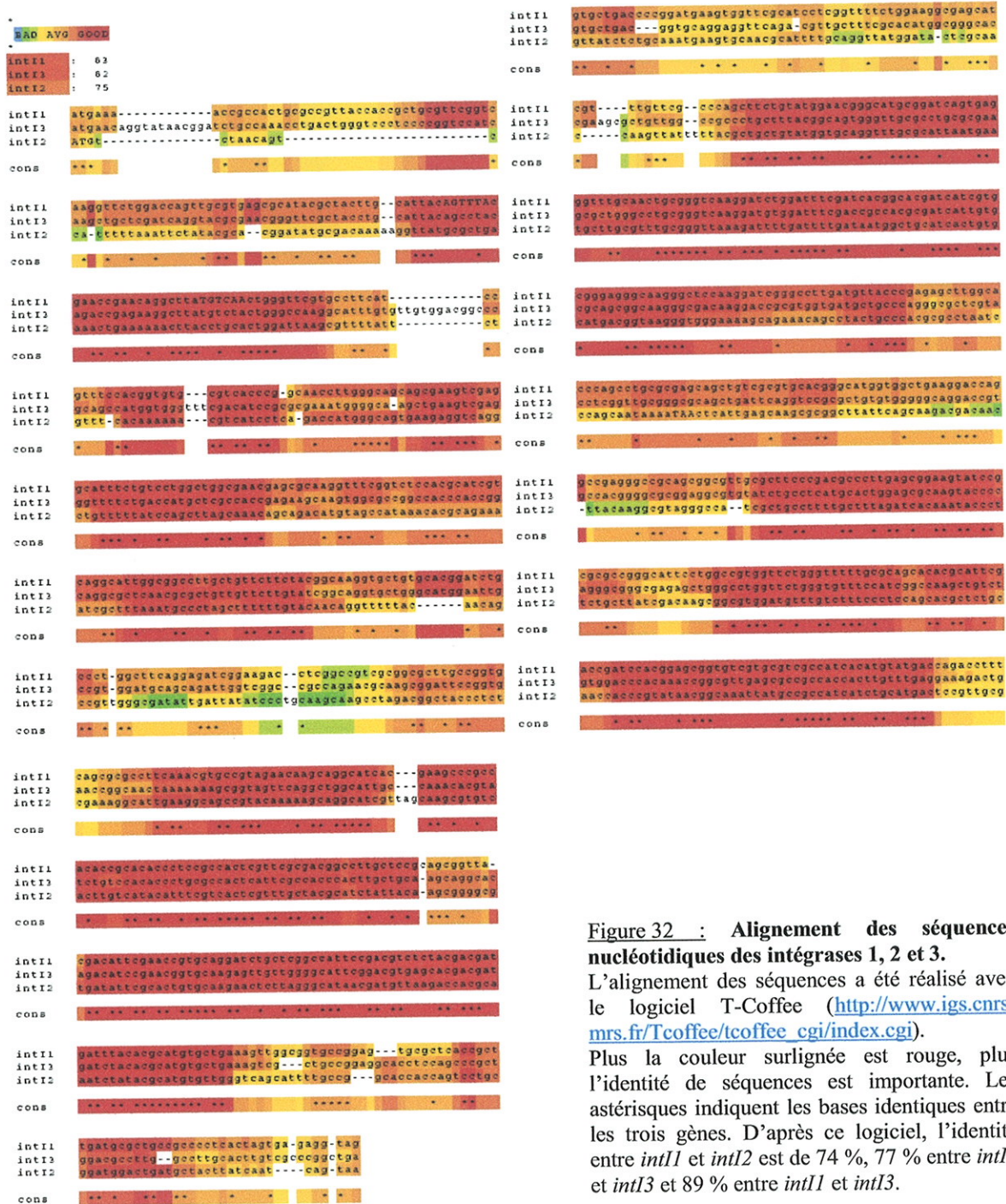


Figure 32 : Alignement des séquences nucléotidiques des intégrases 1, 2 et 3.
 L'alignement des séquences a été réalisé avec le logiciel T-Coffee (<http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>). Plus la couleur surlignée est rouge, plus l'identité de séquences est importante. Les astérisques indiquent les bases identiques entre les trois gènes. D'après ce logiciel, l'identité entre *intI1* et *intI2* est de 74 %, 77 % entre *intI2* et *intI3* et 89 % entre *intI1* et *intI3*.

Seules deux publications font état de l'utilisation de la PCR en temps réel pour la détection des intégrons de résistance. Maguire et ses collaborateurs [163] ont été les premiers en 2001 à appliquer cette technique, mais ils ne se sont attachés qu'à la détection des

intégrons de classe 1 et n'ont travaillé que sur de l'ADN de souches. Par ailleurs, leur technique faisait appel à la chimie SYBR[®] Green. En 2005, Skurnik et ses collaborateurs ont mis au point une PCR en temps réel multiplex avec chimie SYBR[®] Green pour la détection des trois classes d'intégrons sur des souches d'*Escherichia coli* [132]. Malgré l'intérêt épidémiologique évident de cette publication, la description de la partie technique concernant la PCR en temps réel est plus que sommaire et largement critiquable : aucune courbe d'amplification ni de dissociation n'apparaît, aucune expérimentation ne mentionne le comportement de cette PCR multiplex en cas de souche hébergeant deux intégrons. De plus, rien n'indique si cette technique est applicable à des échantillons d'ADN autres que des souches d'*Escherichia coli* : aucune information ne permet de connaître la sensibilité de la réaction, ni sa spécificité. La technique développée par les auteurs reste néanmoins performante et *a priori* bien adaptée à l'utilisation qu'ils ont souhaitée en faire : ils l'ont d'ailleurs mise à profit à nouveau en 2006 sur une collection de près de 350 souches d'*Escherichia coli* isolés d'animaux [122], sans apporter plus de précision quant à la mise au point de leur technique.

L'ensemble des données bibliographiques concernant les intégrons montre qu'il est indispensable, tant sur le plan des résistances que sur le plan épidémiologique, de rechercher les trois classes d'intégrons de résistance à la fois sur des souches bactériennes, mais aussi à partir de prélèvements polybactériens (selles par exemple) ou environnementaux dans lesquels les concentrations en intégrons sont faibles. Pour ce faire, il est nécessaire de disposer d'un outil performant qui allie une grande sensibilité et une grande spécificité, tout en garantissant une détection simultanée et rapide des trois classes d'intégrons de résistance, aussi bien sur des souches bactériennes qu'à partir d'échantillons extraits d'environnements plus complexes. La PCR en temps réel multiplex, réalisée avec des sondes fluorogéniques de type Taqman[®], nous a semblé être l'outil le mieux adapté à ce type de problématique.

L'objectif principal de nos travaux était de mettre au point une PCR en temps réel multiplex capable de détecter rapidement et de façon spécifique des intégrons de résistance au sein de souches bactériennes, mais aussi au sein d'environnements génétiques plus complexes. Deux applications de la technique ont été menées : la première a porté sur l'analyse de souches isolées d'hémocultures, la seconde sur la détection d'intégrons à partir de liquides biologiques prélevés chez des patients à la phase aiguë d'un sepsis sévère.

La détection des intégrons directement dans les liquides biologiques peut présenter un intérêt non seulement épidémiologique dans des études de surveillance de résistance, mais aussi un intérêt clinique dans la prise en charge de patients admis à l'hôpital pour un épisode septique. En effet, différentes études ont montré qu'il existait un lien entre présence d'intégrons chez des bactéries et multirésistance aux antibiotiques [123, 129]. La présence d'intégrons est donc un marqueur pertinent de résistance aux antibiotiques. De plus en plus, les études surveillant la résistance aux antibiotiques s'attachent à détecter non seulement les bactéries multirésistantes (BMR), mais aussi à identifier les supports génétiques de ces résistances.

Matériels et méthodes

III. Matériels et méthodes

A. Souches bactériennes et plasmides

1. Souches et plasmides témoins

Les souches bactériennes et plasmides mentionnés dans le tableau 4 ont été utilisés lors de la mise au point de la PCR en temps réel comme témoins positifs d'amplification.

Souches bactériennes	Caractéristiques	Source	Phénotype*
<i>Escherichia coli</i> DH5 α 3614	Bactérie renfermant le vecteur <i>pSU38 ΔtotlacZ::intI1-catB9</i> .	Laboratoire EA 3175	Km ^r , Cm ^r
<i>Escherichia coli</i> JM109 3682	Bactérie hébergeant le vecteur <i>pGEM[®]-T Easy::intI2</i> .	Laboratoire EA 3175	Amp ^r
<i>Escherichia coli</i> DH5 α 3603	Bactérie hébergeant le vecteur <i>pBAD::intI3</i> .	Dr Didier Mazel (Institut Pasteur)	Amp ^r
<i>Shigella dysenteriae</i> 3Sh	Bactérie hébergeant un intégron de classe 1 : cassettes <i>dfxA15</i> et <i>aadA1</i> .	Laboratoire EA 3175	Tmp ^r , Sm ^r , Sp ^r , Sul ^r
<i>Shigella sonnei</i> 21Sh	Bactérie hébergeant un intégron de classe 2 : cassettes <i>dfxA1-aadA1-sat1</i> .	Laboratoire EA 3175	Tmp ^r , Sm ^r , Sp ^r
<i>Shigella dysenteriae</i> 28Sh	Bactérie hébergeant un intégron de classe 1 et un intégron de classe 2.	Laboratoire EA 3175	Tmp ^r , Sul ^r

Plasmides	Caractéristiques	Source	Phénotype*
<i>pSU38- ΔtotlacZ::intI1-catB9</i>	Plasmide dérivé de <i>pSU38</i> . Le promoteur du gène <i>lacZ</i> a été délété ainsi que son codon initiateur ATG. L'intégron <i>intI1-catB9</i> a été construit par PCR assemblage et cloné dans ce vecteur aux sites <i>EcoRI-BamHI</i> .	Laboratoire EA 3175	Tra ^r , Mob ^r Km ^r , Cm ^r
<i>pGEM[®]-T Easy::intI2</i>	Le gène <i>intI2</i> a été cloné de son codon start à son codon stop dans le vecteur <i>pGEM[®]-T Easy</i> (Promega).	Laboratoire EA 3175	Tra ^r , Mob ^r Amp ^r
<i>pBAD18::intI3</i>	Le gène <i>intI3</i> a été cloné de son codon start à son codon stop dans le vecteur <i>pBAD18</i> .	Dr Didier Mazel (Institut Pasteur)	Tra ^r , Mob ^r Amp ^r

Tableau 4 : Souches bactériennes utilisées lors de la mise au point de la PCR en temps réel.

La cassette *catB9* (chloramphénicol acétyltransférase) confère une résistance au chloramphénicol. La cassette *dfxA15* (dihydrofolate réductase) confère une résistance au triméthoprime. La cassette *aadA1* (aminoside acétyltransférase) confère une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine.

* Km, kanamycine. Amp, ampicilline. Tmp, triméthoprime. Sm, streptomycine. Sp, spectinomycine. Sul, sulfaméthoxazole. Cm, chloramphénicol.

De plus, 19 souches bactériennes de phénotype sauvage, c'est-à-dire présentant seulement leur phénotype de résistance naturelle aux antibiotiques, ont été sélectionnées au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges. Ces souches, sans aucune résistance acquise, et donc *a priori* dénuées d'intégrons de résistance, ont servi de témoins négatifs. Ont ainsi été sélectionnées 12 bactéries à Gram négatif (plusieurs espèces d'entérobactéries : *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, mais

aussi d'autres bacilles à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Campylobacter coli*, *Vibrio alginolyticus*) et 6 bactéries à Gram positif (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*). De plus, une souche de *Vibrio cholerae* a été utilisée afin d'évaluer une éventuelle réaction croisée avec le gène d'intégrase *VchIntI* présent au sein du superintégron localisé sur le chromosome de cette bactérie.

2. Souches cliniques

- Souches isolées d'hémocultures chez des patients hospitalisés en Réanimation

Après dédoublement (souche de même espèce et de même antibiogramme isolée à plusieurs reprises chez un même patient), 49 souches de bactéries à Gram négatif ont été isolées d'hémocultures chez 43 patients hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges entre le 1^{er} janvier et le 31 décembre 2006 : 37 souches appartenaient à la famille des entérobactéries dont plus d'un tiers à l'espèce *Escherichia coli*, les 12 autres à des bactéries non fermentantes, majoritairement du genre *Pseudomonas* [Tableau 5].

Espèces bactériennes	Nombre de souches isolées
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Serratia marcescens</i>	4
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Citrobacter koseri</i>	2
<i>Morganella morganii</i>	2
<i>Proteus vulgaris</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Hafnia alvei</i>	1
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1
<i>Salmonella</i> Dublin	1

Espèces bactériennes	Nombre de souches isolées
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
<i>Pseudomonas putida</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1

Tableau 5 : Souches bactériennes isolées d'hémocultures chez des patients hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges entre le 1^{er} janvier et le 31 décembre 2006.

Le tableau de gauche rassemble les entérobactéries, celui de droite les bacilles à Gram négatif non fermentants.

- Souches isolées d'hémocultures et de liquides biologiques chez des patients à la phase aiguë d'un sepsis sévère

Après dédoublement (souche de même espèce et de même antibiogramme isolée de différents sites chez un même patient), 11 souches de bactéries à Gram négatif ont été isolées d'hémocultures ou de liquides biologiques prélevés chez 24 patients à la phase aiguë d'un sepsis sévère. Les bactéries isolées comprenaient 9 souches d'entérobactéries (5 *Escherichia coli*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Citrobacter koseri*) et 2 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches cliniques a été réalisée à l'aide de l'automate Vitek[®]2 grâce aux cartes AST-N017 et GN (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ou par la technique de diffusion en milieu gélosé sur milieu Müller-Hinton 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) [164].

C. Prélèvements biologiques des patients en sepsis sévère

Entre le 13 juillet 2006 et le 2 mai 2007, pour tout patient admis dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges et répondant à des critères de sepsis sévère [165], ont été prélevés le jour de l'admission des flacons d'hémoculture par ponction périphérique, des tubes secs de sang total sur le même bras de ponction, et des liquides biologiques en fonction du lieu suspecté de l'infection (urine, aspiration bronchique, liquide péritonéal...). Les hémocultures ont été incubées dans l'automate BacT/ALERT[®] 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ; celles positives ont été analysées dans le cadre de l'activité de routine du laboratoire. Après centrifugation des tubes de sang total, les sérums ont été conservés à -80°C jusqu'à extraction de l'ADN. Les liquides biologiques ont été divisés en deux parties : une partie a été congelée à -80°C jusqu'à extraction de l'ADN, l'autre a été ensemencée et analysée dans le cadre de l'activité de routine du laboratoire.

D. Extraction de l'ADN

1. Souches bactériennes

Les ADN génomiques ont été extraits par la méthode dite d'ébullition ou *boiling* : une suspension dense de colonies bactériennes, équivalente à 3 McFarland, a été réalisée dans 400 μ L d'eau distillée. Après homogénéisation, le milieu a été mis à bouillir 20 minutes puis centrifugé 5 minutes à 12 000 g. Les essais ont été réalisés à partir de 5 μ L du surnageant.

2. Plasmides

L'extraction des ADN plasmidiques a été réalisée à l'aide du kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification system (Promega, Charbonnières les bains, France) selon les recommandations du fabricant.

3. Liquides biologiques

Les ADN des 24 sérums de patients en phase aiguë de sepsis sévère et des 34 liquides biologiques correspondants collectés ont été extraits à l'aide du kit QIAamp[®] DNA Mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France). Ils ont été soumis à la réaction de PCR en temps réel multiplex à raison de 5 μ L d'extrait.

E. Préparation des gammes de plasmides témoins

Les plasmides *pSU38 Δ tot-lacZ::intI-catB91*, *pGEM[®]-T Easy::intI2* et *pBAD ::intI3* ont servi de gamme pour la quantification respective des gènes *intI1*, *intI2* et *intI3*. Les ADN plasmidiques extraits après culture sur la nuit dans un bouillon cœur-cerveille ont été dosés par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm.

Le nombre de copies de plasmides par microlitre a été estimé en utilisant la formule suivante :

$$\frac{6,023 \cdot 10^{23} \text{ (copies.mol}^{-1}\text{)} \times \text{concentration ADN plasmidique (g.}\mu\text{L}^{-1}\text{)}}{\text{Poids moléculaire du plasmide (g.mol}^{-1}\text{)}}$$

Une dilution adéquate a été réalisée de façon à obtenir une concentration en ADN cible de 10^9 copies par 5 μL . Cette concentration a été aliquotée, puis conservée à la température de -80°C . Par la suite, des dilutions successives de chaque plasmide extrait ont été préparées extemporanément à partir d'un aliquot à 10^9 copies, afin de générer une gamme d'étalonnage allant de 10^8 à 10^1 copies d'ADN cible par 5 μL .

F. Choix des amorces et des sondes

Les amorces et sondes utilisées dans le cadre de la PCR quantitative ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, juin 2006). Leur conception a été faite selon plusieurs critères, certains liés aux gènes cibles, d'autres aux amorces et sondes elles-mêmes.

1. Critères liés aux gènes

Concernant le gène *int11* tout d'abord, plus d'une centaine de séquences publiées ont été comparées à l'aide d'un logiciel informatique d'alignements multiples, ClustalW, disponible sur Internet (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>, juin 2006). L'objectif était de positionner les amorces et les sondes dans les zones du gène les plus conservées afin de détecter la totalité des variants du gène.

Malgré un nombre de descriptions et donc de séquences analysées moindre, la même procédure a été réalisée pour les gènes *int12* et *int13*.

2. Critères liés aux amorces

Les amorces utilisées ont été dessinées de façon à ce qu'elles possèdent toutes un T_m plus ou moins équivalent, situé aux alentours de 60°C. Ce choix de T_m comparable entre toutes les amorces était la condition *sine qua non* de la mise au point d'une PCR multiplex. Un autre critère majeur a été de limiter au maximum l'hybridation d'une amorce non seulement avec elle-même et avec l'amorce du même couple, mais aussi avec les autres amorces et sondes utilisées pour l'amplification des autres gènes. De plus, les amorces ont été choisies de façon à éviter au maximum une hybridation non spécifique sur un autre site du gène et sur l'un ou les deux autres gènes d'intégrases.

La taille des amorces a été fixée entre 18 et 25 nucléotides, avec un GC % entre 40 et 60 %. Les couples retenus devaient amplifier des fragments de taille inférieure à 200 paires de bases, comme souvent recommandé en PCR temps réel (idéalement, moins de 150 paires de bases).

3. Critères liés aux sondes

Le choix des sondes s'est rapidement porté sur les sondes fluorogéniques de type Taqman[®], grâce notamment à leur facilité de conception. Chaque sonde a été marquée par un fluorophore différent : la sonde ciblant *intI1* par 6-FAM, celle ciblant *intI2* par TexasRed et celle ciblant *intI3* par Cy3. En raison du multiplexage, des *quencher*s de type BHQ[®] ont été retenus. Les sondes ont été dessinées de façon à ce qu'elles possèdent toutes un T_m situé aux alentours de 70°C, écart de température avec le T_m des amorces nécessaire à une PCR en temps réel réalisée en chimie Taqman[®]. A l'image des amorces, les hybridations de la sonde avec elle-même et avec les autres sondes et amorces ont été limitées au maximum. Leur taille a été fixée entre 20 et 35 nucléotides. Celles possédant une guanine en 5' ont été exclues à cause de l'effet *quencher* de cette base.

Les amorces et sondes utilisées ont été synthétisées par le laboratoire Sigma-Proligo (St-Quentin, France). Une seule sonde par gène a été synthétisée, différents couples d'amorces encadrant les sondes ont été retenus. Les séquences des amorces et sondes testées sont détaillées dans le tableau 6.

Amorces	Séquences (5' - 3')
<i>int11-LC1</i>	GCC TTG ATG TTA CCC GAG AG
<i>int11-LC2</i>	TTC GTG ATG CCT GCT TGT T
<i>int11-LC3</i>	GCC CTT GAG CGG AAG TAT C
<i>int11-LC4</i>	TGA TGC CTG CTT GTT CTA CG
<i>int11-LC5</i>	GAT CGG TCG AAT GCG TGT
<i>int12-LC1</i>	GGG CAG TGA AGA GGT CAG G
<i>int12-LC2</i>	TGC TTT TCC CAC CCT TAC C
<i>int12-LC3</i>	GAC GGC TAC CCT CTG TTA TCT C
<i>int13-LC1</i>	GCC ACC ACT TGT TTG AGG A
<i>int13-LC2</i>	GGA TGT CTG TGC CTG CTT G
Sondes	Séquences (5' - 3')
<i>int11-probe</i>	(6-Fam) ATT CCT GGC CGT GGT TCT GGG TTT T (BHQ1)
<i>int12-probe</i>	(TexasRed) TGG ATA CTC GCA ACC AAG TTA TTT TTA CGC TG (BHQ2)
<i>int13-probe</i>	(Cy3) CGC CAC TCA TTC GCC ACC CA (BHQ2)

Tableau 6 : Amorces et sondes utilisées lors de la mise au point de la PCR en temps réel.
BHQ : *black hole quencher*.

G. Mise au point des PCR simplex

Une fois les amorces et les sondes dessinées, la première étape a été de mettre au point trois PCR en temps réel indépendantes pour la détection de chacune des trois intégrases. L'ensemble des réactions a été mené sur l'appareil SmartCycler® II (Cepheid®).

Le réactif LightCycler FastStart® DNA Master Hybridization Probes (Roche, Meylan, France) a été employé pour l'ensemble des essais de PCR en temps réel. Chaque réaction de PCR simplex contenait 5 µL de la matrice à tester (plusieurs points de gamme, de 10⁷ à 10¹ copies dans 5 µL), 2 µL de MgCl₂ 25 mM (soit une concentration finale de 3 mM), 5 picomoles de sonde marquée (soit une concentration finale de 0,2 µM), 10 picomoles d'amorces (soit une concentration finale de 0,4 µM), 2,5 µL de FastStart® (tampon 10X, dNTP et polymérase) puis de l'eau pour un volume final de 25 µL. Les conditions d'amplification étaient de 10 minutes à 95°C (activation de la polymérase), suivies de 50 cycles de 30 secondes à 95°C, puis 1 minute à 60°C. La fluorescence a été mesurée dans le canal correspondant au fluorophore employé, à la fin de chaque étape d'élongation. Le seuil de fluorescence a été arbitrairement fixé à 30 unités de fluorescence pour FAM, 10 pour TexasRed, et 10 pour Cy3.

Plusieurs couples d'amorces encadrant la sonde *int11-probe* ont été testés : *int11-LC1* + *int11-LC2* (287 pb), *int11-LC1* + *int11-LC4* (283 pb), *int11-LC1* + *int11-LC5* (196 pb), *int11-LC3* + *int11-LC2* (173 pb), *int11-LC3* + *int11-LC4* (169 pb), *int11-LC3* + *int11-LC5* (82 pb).

Deux couples d'amorces encadrant la sonde *intI2-probe* ont été testés : *intI2-LC1* + *intI2-LC2* (356 pb), *intI2-LC3* + *intI2-LC2* (195 pb). Un seul couple d'amorces a été utilisé pour l'amplification du gène *intI3* : *intI3-LC1* + *intI3-LC2* (138 pb).

1. Essais de sensibilité, choix des amorces

Les couples d'amorces permettant de détecter le plus faible nombre de copies du gène cible (soit 10 copies) ont été retenus. Afin d'optimiser la réaction, différentes concentrations en amorces ont été testées (de 0,2 à 0,8 μM) pour déterminer les conditions qui donnaient la meilleure efficacité d'amplification avec les C_t les plus précoces. Pour chacune des réactions, les efficacités ont été calculées en tenant compte de 6 points de gamme de 10^8 à 10^3 copies et en excluant du calcul les points 10^2 et 10^1 . En effet, ces derniers permettent de connaître la sensibilité de la réaction, mais ils sont soumis à des biais de pipetage : le risque pour un point à 10 copies théorique est de pipeter une fois 10 copies, mais parfois 15 ou au contraire 5 copies. Il n'est donc pas recommandé de les intégrer dans les calculs d'efficacité.

2. Essais de spécificité

Afin de vérifier la spécificité des amorces, les couples retenus pour chacune des PCR simplex ont été testés sur les deux autres gènes, ainsi que sur les souches témoins. Ainsi, la PCR simplex ciblant le gène *intI1* a été évaluée en présence de 10^8 , 10^7 et 10^6 copies du gène *intI2*, de l'ADN génomique de la souche *Shigella* 21Sh ainsi qu'en présence de 10^8 , 10^7 , 10^6 copies du gène *intI3* et de l'ADN génomique de la souche *Escherichia coli* 3603. Les mêmes essais ont été réalisés pour la PCR simplex *intI2* avec les gènes *intI1* et *intI3*, ainsi que pour la PCR simplex *intI3* avec les gènes *intI1* et *intI2*.

3. Essais de reproductibilité

Afin de vérifier la reproductibilité de la réaction, pour chacune des trois PCRs simplex, huit points de la gamme témoin, de 10^8 à 10^1 copies, ont été testés lors de trois manipulations différentes, dans le but d'établir une moyenne et un écart-type des C_t pour chacun des points testés.

H. Mise au point de la PCR multiplex

La principale différence par rapport aux PCRs simplex a résidé dans la concentration en $MgCl_2$: celle-ci a dû être augmentée à la concentration finale de 6 mM (soit 5 μL de $MgCl_2$ 25 mM). Le programme d'amplification et les concentrations en sondes sont restés identiques à ceux utilisés en PCR simplex. Les couples d'amorces retenus ont été les suivants : *intI1-LC1* + *intI1-LC5*, *intI2-LC2* + *intI2-LC3* et *intI3-LC1* + *intI3-LC2*.

Chaque réaction de PCR multiplex contenait 5 μL de la matrice à tester, 5 μL de $MgCl_2$ 25 mM (soit une concentration finale de 6 mM), 5 picomoles de chacune des trois sondes (soit une concentration finale de 0,2 μM), 10 picomoles de chacune des six amorces (soit une concentration finale de 0,4 μM), 2,5 μL de FastStart® (tampon 10X et polymérase) puis de l'eau pour un volume final de 25 μL .

Les seuils de fluorescence fixés en PCR simplex sont restés identiques, excepté pour le canal Cy3, où le seuil a été augmenté à 15 unités de fluorescence, et ce en raison d'une émission de fluorescence parasite du fluorophore FAM dans le canal Cy3 (chevauchement des spectres [Figure 27], bande passante de l'appareil trop large).

1. Essais de sensibilité et de reproductibilité

L'objectif des travaux était d'avoir une sensibilité maximale dans des conditions de PCR multiplex, afin de pouvoir détecter de très faibles concentrations en intégrase *intI1*, *intI2* ou *intI3*, et ce, quelle que soit la concentration des différents gènes présents dans l'échantillon à analyser.

Trois types d'essais ont donc été menés :

- Les gammes ont tout d'abord été testées individuellement, de 10^8 à 10^1 copies, sur trois réactions différentes afin de connaître la reproductibilité de la réaction et de noter une éventuelle amplification non spécifique dans un canal de fluorescence autre que celui testé.
- Des gammes croisées de deux gènes ont été réalisées de façon à ce que pour chaque point testé du gène numéro 1 corresponde une gamme de points du gène numéro 2. Les points 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10^1 ont été ainsi testés, soit une gamme croisée de 25

points au total. Les points 10^7 , 10^5 et 10^3 ont servi à calculer l'efficacité de la réaction, les points 10^2 et 10^1 sa sensibilité. Seuls 5 points par gène ont pu être testés, en raison de la capacité d'échantillonnage de l'appareil SmartCycler® II, et du volume réactionnel minimum de 25 μ L ; pour ces raisons, il n'était pas possible de réaliser plus de 27 tests lors de chaque essai. Trois gammes croisées différentes ont été réalisées chacune deux fois : gammes croisées *intI1 / intI2*, *intI2 / intI3* et *intI1 / intI3*.

- Enfin, la gamme croisée *intI1 / intI2* citée précédemment a été testée en ajoutant pour tous les points des concentrations fixes du gène *intI3* : 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10^1 copies, soit un total de 5 essais différents menés seulement une fois.

2. Essais de spécificité

Afin de vérifier la spécificité de la réaction de PCR multiplex, les ADN génomiques des souches témoins ont été testés : souches de *Shigella* 3Sh (*intI1+*), 21 Sh (*intI2+*), 28Sh (*intI1+*, *intI2+*), et souche *Escherichia coli* DH5 α 3603 (*intI3+*), ainsi que la totalité des 19 souches bactériennes sélectionnées dénuées d'intégron.

1. Analyse statistique des résultats « intégrons en microbiologie clinique »

Les analyses statistiques des résultats visant à évaluer un lien entre intégron et résistance ont été effectuées avec le test exact de Fischer qui peut s'appliquer à de faibles populations.

Les valeurs de $p \leq 0,05$ ont été considérées comme significatives ; celles inférieures à 0,01 ont été considérées comme très significatives.

Elles ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Software disponible gratuitement sur Internet : <http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>. (septembre 2007).

Résultats

IV. Résultats

A. Mise au point de la PCR en temps réel multiplex

1. Mise au point des PCR simplex

Avant de mettre au point la PCR multiplex, il a d'abord fallu passer par une étape de mise au point des PCR simplex afin de retenir les couples d'amorces les plus performants et donc les plus à même d'être candidats à la PCR multiplex. Les différents couples d'amorces disponibles pour chacun des gènes ciblés ont donc été testés.

a. PCR simplex *int11*

▪ Essais de sensibilité, choix des amorces

La première étape a été de choisir le couple d'amorces situées de part et d'autre de la sonde *int11* qui soit le plus efficace et qui donne la meilleure sensibilité d'amplification. Après essai de chacun des couples d'amorces disponibles pour l'amplification du gène *int11*, le choix s'est porté sur le couple *int11-LC1* + *int11-LC5*. En effet, cette association a donné les meilleurs résultats, tant en terme d'efficacité que de sensibilité, tout en donnant les C_t les plus précoces. Les couples *int11-LC1* + *int11-LC2*, *int11-LC1* + *int11-LC4* et *int11-LC3* + *int11-LC2* ne permettaient pas de descendre la sensibilité de la réaction en deçà de 10^2 copies. Le couple *int11-LC3* + *int11-LC4* détectait 10^1 copies, mais seulement une fois sur deux. Concernant le couple *int11-LC3* + *int11-LC5*, la réaction d'amplification était très efficace, et le seuil de sensibilité à 10^1 copies était correctement atteint ; il a néanmoins été écarté en raison de la forte concentration en amorces ($0,8 \mu\text{M}$ au moins) nécessaire à une amplification correcte. Or, dans le cadre d'une mise au point d'une réaction multiplex, il est recommandé de limiter au maximum les concentrations en amorces, afin d'éviter des phénomènes de compétition.

L'essai visant à déterminer la concentration optimale en amorces n'a pas montré de différence significative. Il a donc été décidé de maintenir la concentration finale en amorces *int11-LC1* et *int11-LC5* à $0,4 \mu\text{M}$.

- Essais de spécificité

Aucune amplification aspécifique n'a été détectée en présence de 10^6 , 10^7 , ni même 10^8 copies des gènes *intI2* ou *intI3*, pas plus qu'en présence de l'ADN génomique des souches *Shigella* 21Sh (*intI2* +) et *Escherichia coli* 3603 (*intI3* +).

- Essais de reproductibilité

La figure 33 illustre le type de courbes obtenues à l'issue d'une PCR simplex *intI1*.

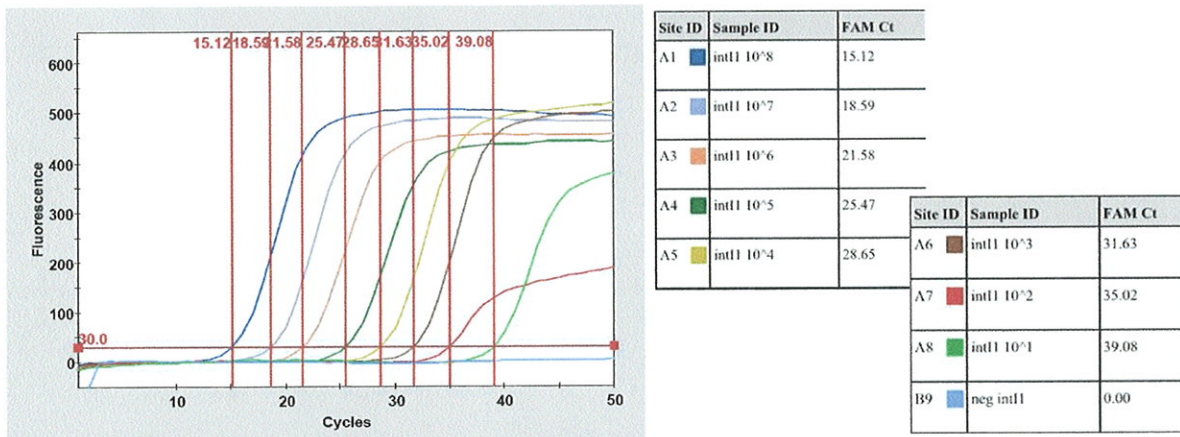


Figure 33 : PCR simplex *intI1*. Gamme 10^8 à 10^1 copies.

Chaque courbe colorée représente l'amplification d'un point de la gamme *pSU38Atot-lacZ::intI1*. L'amplification est assurée du point 10^8 copies ($C_t = 15,12$) au point 10^1 copies ($C_t = 39,08$). La courbe bleu clair représente le témoin négatif (eau). Le seuil de fluorescence a été fixé à 30 unités de fluorescence.

Il est à noter que la fluorescence émise par le fluorophore FAM émettait un signal non spécifique dans le canal Cy3 au-delà du seuil (fixé à 10), alors même que la sonde Cy3 n'était pas présente [Figure 34].

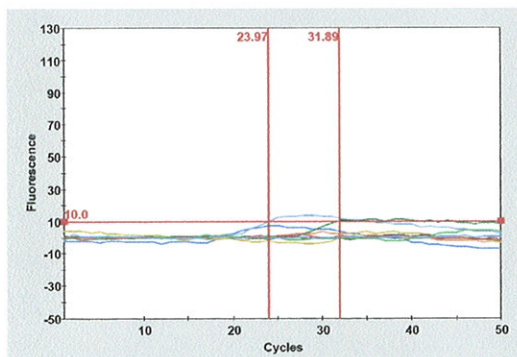


Figure 34 : Fluorescence de FAM dans le canal Cy3.

Ces courbes représentent la fluorescence parasite de la sonde *intI1* marquée par le fluorophore FAM, dans le canal Cy3. L'expérimentation a pourtant été menée avec la seule sonde *intI1* présente. Cette fluorescence parasite a nécessité d'augmenter le seuil de fluorescence de Cy3 à 15 unités de fluorescence dans le cas d'essais menés en PCR multiplex.

Les résultats des trois essais de PCR simplex *intI1* sont résumés dans le tableau 7. La figure 35 représente la droite $C_t = f(\log[\textit{intI1}])$. Elle a été tracée après calcul de la moyenne des C_t des trois essais effectués.

Gamme (copies)	PCR simplex <i>intI1</i>			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
1,00E+08	15,12	15,16	14,72	15,00	0,24
1,00E+07	18,59	18,64	18,27	18,50	0,20
1,00E+06	21,58	21,28	20,69	21,18	0,45
1,00E+05	25,47	25,16	25,37	25,33	0,16
1,00E+04	28,65	28,71	28,19	28,52	0,28
1,00E+03	31,63	31,62	31,38	31,54	0,14
1,00E+02	35,02	35,19	34,53	34,91	0,34
1,00E+01	39,08	39,38	38,80	39,09	0,29
Pente	-3,332	-3,325	-3,364	-3,340	
Ordonnée à l'origine	41,83	41,72	41,61	41,72	
Efficacité	100%	100%	98%	99%	
R ²	0,9988	0,9980	0,9953	0,9979	

Tableau 7 : PCR simplex *intI1*. C_t obtenus lors des essais 1, 2 et 3.

Pour chaque essai mené, la pente de la droite $C_t = f(\log[\textit{intI1}])$, l'efficacité, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation ont été calculés en prenant en compte les points 10^8 à 10^3 copies. L'efficacité moyenne de la réaction (fond jaune) a été calculée à partir des C_t moyens correspondants aux points 10^8 à 10^3 copies.

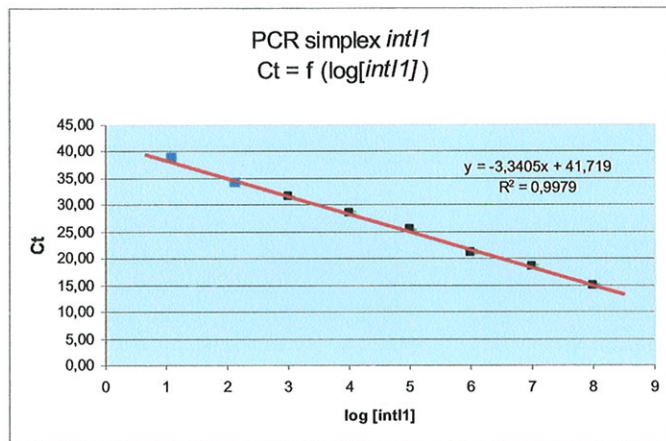


Figure 35 : PCR simplex. $C_t = f(\log[\textit{intI1}])$
 Cette courbe a été tracée en tenant compte de la moyenne des C_t obtenus au cours des trois expérimentations. L'équation de la droite tient compte des points 10^8 à 10^3 copies. Les points 10^1 et 10^2 copies ont été rajoutés en bleu sur la courbe.

La PCR simplex *intI1* a montré une très bonne reproductibilité, les écarts-types des différents points ne dépassant pas la valeur de 0,5, y compris avec les faibles nombres de copies. L'efficacité de l'amplification est optimale à chacun des essais, elle est en moyenne de 99 %.

Il s'agit donc d'une PCR reproductible, sensible, et spécifique du gène *intI1*. La réaction a été validée pour une gamme de concentrations allant de 10^8 à 10^1 copies du gène *intI1* pour 5 μ L d'échantillon.

b. PCR simplex *intI2*

▪ Essais de sensibilité, choix des amorces

Avec le couple *intI2-LC1* + *intI2-LC2*, il a été impossible d'abaisser le seuil de sensibilité en deçà 10^4 copies, et ce malgré de nombreux essais : modification de la concentration en amorces, températures d'élongation allongées... A l'inverse, de très bons résultats ont été obtenus avec le couple *intI2-LC2* + *intI2-LC3*, aussi bien en terme de sensibilité (10^1 copies), que de reproductibilité. Ce couple a donc été retenu.

L'essai visant à déterminer la concentration optimale en amorces n'a pas montré de différence significative pour des concentrations allant de 0,2 à 0,8 μM . Il a donc été décidé de maintenir la concentration finale en amorces *intI2-LC2* et *intI2-LC3* à 0,4 μM .

▪ Essais de spécificité

Aucune amplification aspécifique n'a été retrouvée en présence de 10^6 , 10^7 , ni même 10^8 copies des gènes *intI1* ou *intI3*, pas plus qu'en présence de l'ADN génomique des souches *Shigella* 3Sh (*intI1* +) et *Escherichia coli* 3603 (*intI3* +).

▪ Essais de reproductibilité

La figure 36 illustre le type de courbes obtenues à l'issue d'une PCR simplex *intI2*.

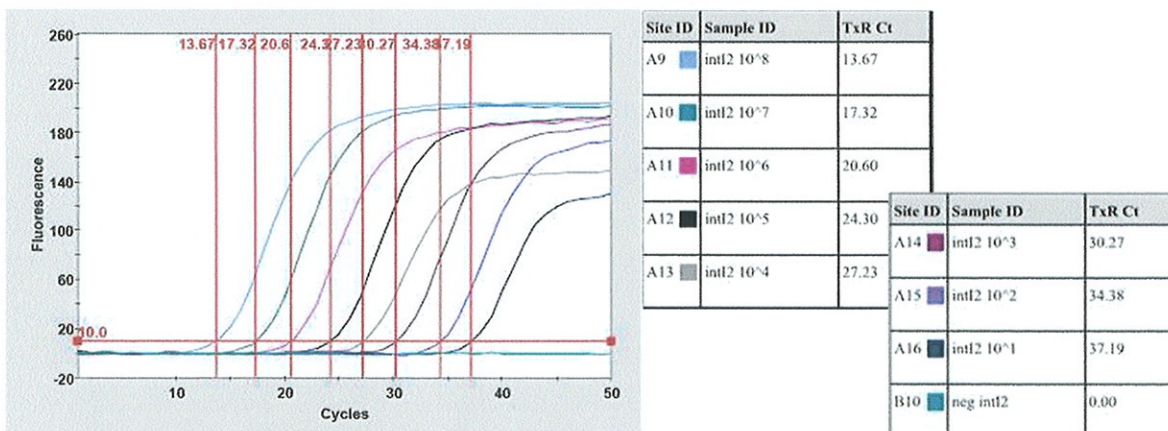


Figure 36 : PCR simplex *intI2*. Gamme 10^8 à 10^1 copies.

Chaque courbe colorée représente l'amplification d'un point de la gamme *pGEM[®]-T Easy::intI2*. L'amplification est assurée du point 10^8 copies ($C_t = 13,67$) au point 10^1 copies ($C_t = 37,19$). La courbe bleu turquoise représente le témoin négatif (eau). Le seuil de fluorescence a été fixé à 10 unités de fluorescence.

Les résultats des trois essais de PCR simplex *intI2* sont résumés dans le tableau 8. La figure 37 représente la droite $C_t = f(\log[\textit{intI2}])$. Elle a été tracée après calcul de la moyenne des C_t des trois essais effectués.

Gamme (copies)	PCR simplex <i>intI2</i>			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
1,00E+08	14,29	14,12	13,67	14,03	0,32
1,00E+07	17,79	17,31	17,32	17,47	0,27
1,00E+06	21,05	20,45	20,60	20,70	0,31
1,00E+05	24,88	24,15	24,30	24,44	0,39
1,00E+04	28,17	27,58	27,23	27,66	0,48
1,00E+03	31,39	30,51	30,27	30,72	0,59
1,00E+02	35,29	33,96	34,38	34,54	0,68
1,00E+01	37,35	38,85	37,19	37,80	0,92
Pente	-3,442	-3,327	-3,327	-3,365	
Ordonnée à l'origine	41,86	40,65	40,53	41,01	
Efficacité	95%	100%	100%	98%	
R ²	0,9995	0,9991	0,9984	0,9993	

Tableau 8 : PCR simplex *intI2*. C_t obtenus lors des essais 1, 2 et 3.

Pour chaque essai mené, la pente de la droite $C_t = f(\log[\textit{intI2}])$, l'efficacité, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation ont été calculés en prenant en compte les points 10^8 à 10^3 copies. L'efficacité moyenne de la réaction (fond jaune) a été calculée à partir des C_t moyens correspondants aux points 10^8 à 10^3 copies.

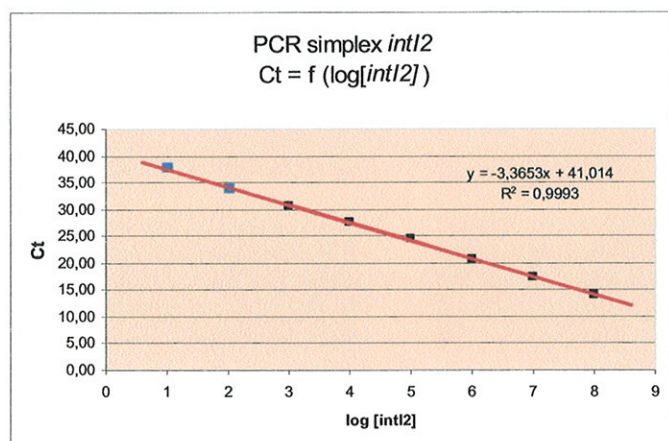


Figure 37 : PCR simplex. $C_t = f(\log[\textit{intI2}])$
 Cette courbe a été tracée en tenant compte de la moyenne des C_t obtenus au cours des trois expérimentations. L'équation de la droite tient compte des points 10^8 à 10^3 copies. Les points 10^1 et 10^2 copies ont été rajoutés en bleu sur la courbe.

La PCR simplex *intI2* a montré une très bonne reproductibilité, les écarts-types des différents points restants inférieurs à 0,6 pour les points 10^8 à 10^3 . A noter, malgré des chiffres tout à fait acceptables, une dispersion d'autant plus importante que le nombre de copies du gène *intI2* diminue. L'efficacité de l'amplification est très bonne à chacun des essais ; en moyenne, elle est de 98 %.

Il s'agit donc d'une PCR reproductible, sensible, et spécifique du gène *intI2*. La réaction a été validée pour une gamme de concentrations allant de 10^8 à 10^1 copies du gène *intI2* pour 5 μ L d'échantillon.

c. PCR simplex *intI3*

- Essais de sensibilité, choix des amorces

D'emblée, le couple *intI3-LC1* + *intI3-LC2* a donné des résultats intéressants. Il n'a donc pas été jugé nécessaire de tester d'autres couples d'amorces.

L'essai visant à déterminer la concentration optimale en amorces n'a pas montré de différence significative pour des concentrations allant de 0,2 à 0,8 μM . Il a donc été décidé de maintenir la concentration finale en amorces *intI3-LC1* et *intI3-LC2* à 0,4 μM .

- Essais de spécificité

Aucune amplification aspécifique n'a été observée en présence de 10^6 , 10^7 , ni même 10^8 copies des gènes *intI1* ou *intI2*, pas plus qu'en présence de l'ADN génomique des souches *Shigella* 3Sh (*intI1* +) et *Shigella* 21 Sh (*intI2* +).

- Essais de reproductibilité

La figure 38 illustre le type de courbes obtenues à l'issue d'une PCR simplex *intI3*.

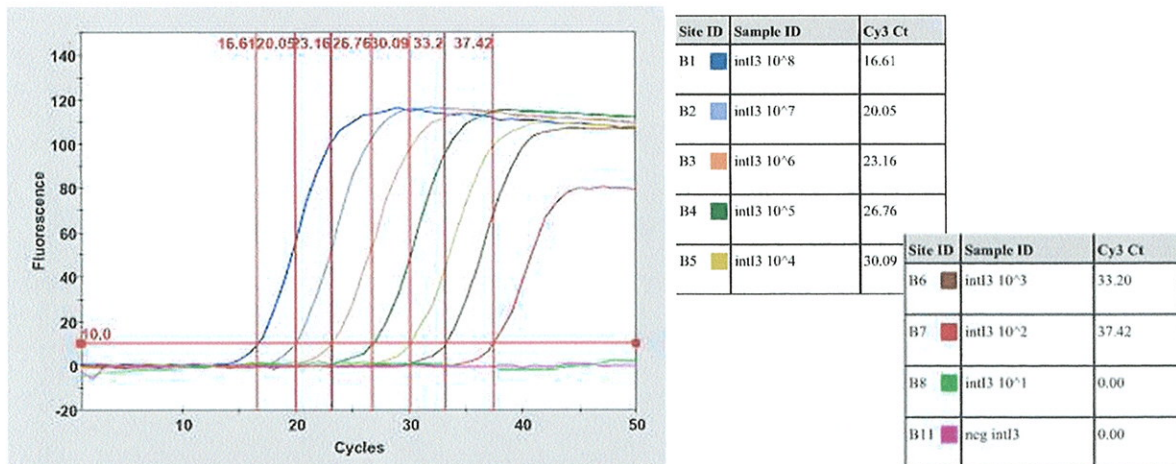


Figure 38 : PCR simplex *intI3*. Gamme 10^8 à 10^1 copies.

Chaque courbe colorée représente l'amplification d'un point de la gamme *pBAD::intI3*. L'amplification est assurée du point 10^8 copies ($C_t = 16,61$) au point 10^2 copies ($C_t = 37,42$). La courbe rose représente le témoin négatif (eau). Le seuil de fluorescence a été fixé à 10 unités de fluorescence.

Les résultats des trois essais de PCR simplex *intI3* sont résumés dans le tableau 9. La figure 39 représente la droite $C_t = f(\log[\textit{intI3}])$. Elle a été tracée après calcul de la moyenne des C_t des trois essais effectués.

Gamme (copies)	PCR simplex <i>intI3</i>			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
1,00E+08	16,61	16,53	16,35	16,50	0,13
1,00E+07	20,05	19,34	19,61	19,67	0,36
1,00E+06	23,16	22,59	22,81	22,85	0,29
1,00E+05	26,76	26,66	26,35	26,59	0,21
1,00E+04	30,09	29,57	29,86	29,84	0,26
1,00E+03	33,20	32,99	31,54	32,58	0,90
1,00E+02	37,42	37,94	36,80	37,39	0,57
1,00E+01	40,03	38,02	39,67	39,24	1,07
Pente	-3,333	-3,345	-3,150	-3,276	
Ordonnée à l'origine	43,31	43,01	41,74	42,69	
Efficacité	100%	99%	108%	102%	
R ²	0,9997	0,9979	0,9928	0,9986	

Tableau 9 : PCR simplex *intI3*. C_t obtenus lors des essais 1, 2 et 3.

Pour chaque essai mené, la pente de la droite $C_t = f(\log[\textit{intI3}])$, l'efficacité, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation ont été calculés en prenant en compte les points 10^8 à 10^3 copies. L'efficacité moyenne de la réaction (fond jaune) a été calculée à partir des C_t moyens correspondants aux points 10^8 à 10^3 copies.

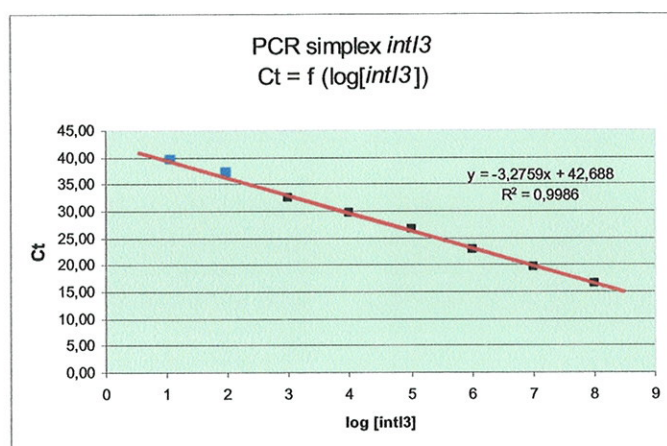


Figure 39 : PCR simplex. $C_t = f(\log[\textit{intI3}])$
 Cette courbe a été tracée en tenant compte de la moyenne des C_t obtenus au cours des trois expérimentations. L'équation de la droite tient compte des points 10^8 à 10^3 copies. Les points 10^1 et 10^2 copies ont été rajoutés en bleu sur la courbe.

La PCR simplex *intI3* a montré une très bonne reproductibilité, les écarts-types des différents points restants inférieurs à 0,4 pour les points 10^8 à 10^4 . L'efficacité de l'amplification est optimale à chacun des essais, elle est en moyenne aux alentours de 100 %.

Il s'agit donc d'une PCR reproductible, sensible, et spécifique du gène *intI3*. La réaction a été validée pour une gamme de concentrations allant de 10^8 à 10^1 copies du gène *intI3* pour 5 μ L d'échantillon.

2. Mise au point de la PCR multiplex

a. Essais de sensibilité et de reproductibilité

- Gammes seules

- *Gamme int11 seule*

La figure 40 illustre le type de courbes obtenues à l'issue d'une PCR triplex du gène *int11*.

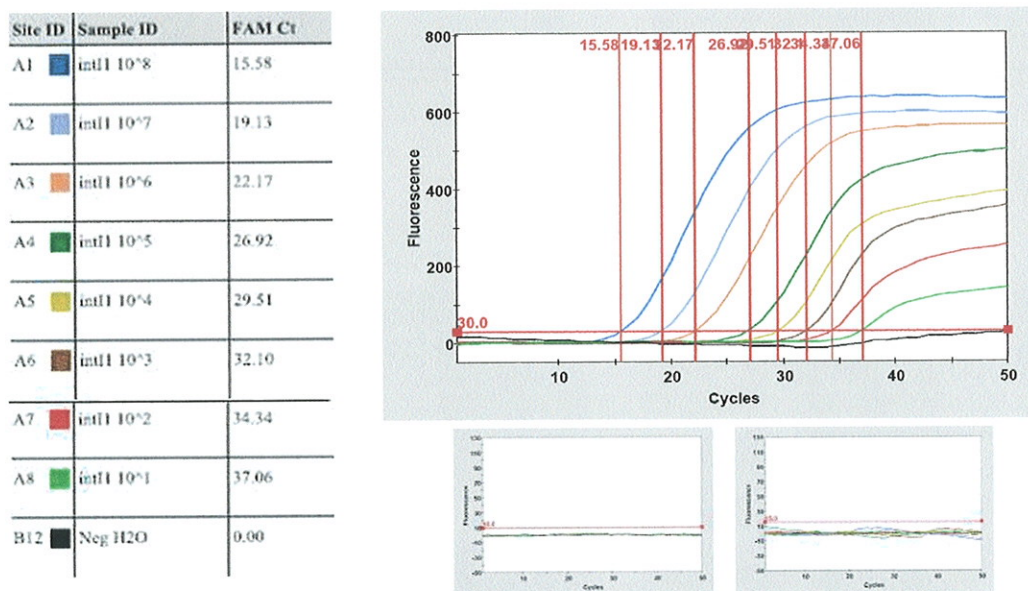


Figure 40 : PCR triplex. Gamme *int11* 10⁸ à 10¹ copies.

Chaque courbe colorée représente l'amplification d'un point de la gamme *pSU38Δtot-lacZ::int11*. L'amplification est assurée du point 10⁸ copies ($C_t = 15,58$) au point 10¹ copies ($C_t = 38,18$). La courbe noire représente le témoin négatif (eau). Le seuil de fluorescence a été fixé à 30 unités de fluorescence. Les deux autres tracés représentent les canaux de lecture des sondes *int12* (TexasRed) et *int13* (Cy3) : aucune fluorescence n'a été constatée dans ces canaux.

Dans les conditions de PCR triplex, l'amplification de tous les points de la gamme *int11*, de 10⁸ à 10¹ copies, s'opère et n'est en fait que peu affectée par la présence supplémentaire de deux couples d'amorces et de deux sondes. Aucun signal de fluorescence n'est émis dans les canaux des sondes *int12* (TexasRed) et *int13* (Cy3), preuve de l'absence de réactions croisées de ces dernières avec l'amplification du gène *int11*.

Les résultats des trois essais de PCR triplex avec la gamme *int11* sont résumés dans le tableau 10. La figure 41 représente la droite $C_t = f(\log[\textit{int11}])$. Elle a été tracée après calcul de la moyenne des C_t des trois essais effectués.

Gamme <i>int11</i> (copies)	PCR Triplex			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
1,00E+08	15,11	15,58	14,92	15,20	0,34
1,00E+07	18,80	19,13	18,10	18,68	0,53
1,00E+06	22,19	22,17	20,97	21,78	0,70
1,00E+05	25,11	26,92	24,35	25,46	1,32
1,00E+04	29,24	29,51	29,06	29,27	0,23
1,00E+03	32,61	32,10	32,14	32,28	0,28
1,00E+02	36,15	34,34	36,62	35,70	1,20
1,00E+01	39,12	38,18	38,94	38,75	0,50
Pente	-3,478	-3,385	-3,496	-3,453	
Ordonnée à l'origine	42,97	42,85	42,48	42,77	
Efficacité	94%	97%	93%	95%	
R ²	0,9986	0,9923	0,9943	0,9990	

Tableau 10 : PCR triplex *int11*. C_t obtenus lors des essais 1, 2 et 3.

Pour chaque essai mené, la pente de la droite C_t = f(log[*int11*]), l'efficacité, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation ont été calculés en prenant en compte les points 10⁸ à 10³ copies. L'efficacité moyenne de la réaction (fond jaune) a été calculée à partir des C_t moyens correspondants aux points 10⁸ à 10³ copies.

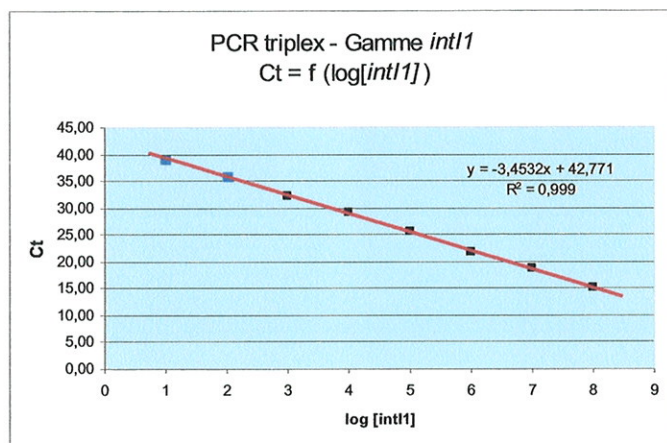


Figure 41 : PCR triplex. C_t = f (log[*int11*])

Cette courbe a été tracée en tenant compte de la moyenne des C_t obtenus au cours des trois expérimentations. L'équation de la droite tient compte des points 10⁸ à 10³ copies. Les points 10¹ et 10² copies ont été rajoutés en bleu sur la courbe.

Les résultats montrent une très bonne reproductibilité des valeurs de C_t avec, qui plus est, une efficacité moyenne de 95 %. Les C_t sont à peine décalés par rapport à ceux obtenus pour des points identiques en condition de PCR simple.

Lorsque le gène *int11* est seul présent dans un mélange réactionnel, il est donc possible dans des conditions de PCR multiplex, de détecter de façon reproductible, jusqu'à 10¹ copies de ce gène, sans que les amorces et sondes dédiées aux amplifications des gènes *int12* et *int13* ne perturbent l'efficacité de la réaction.

o Gamme *intI2* seule

La figure 42 illustre le type de courbes obtenues à l'issue d'une PCR triplex du gène *intI2*.

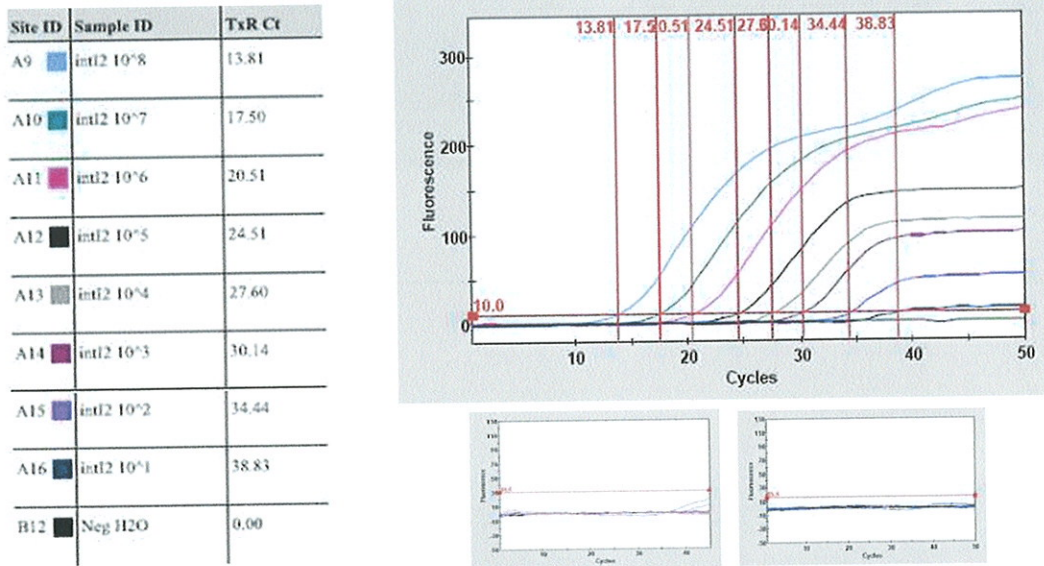


Figure 42 : PCR triplex. Gamme *intI2* 10⁸ à 10¹ copies.

Chaque courbe colorée représente l'amplification d'un point de la gamme *pGEM*[®]-*T Easy::intI2*. L'amplification est assurée du point 10⁸ copies ($C_t = 13,81$) au point 10¹ copies ($C_t = 38,83$). La courbe gris-foncé représente le témoin négatif (eau). Le seuil de fluorescence a été fixé à 10 unités de fluorescence. Les deux autres tracés représentent les canaux de lecture des sondes *intI1* (FAM) et *intI3* (Cy3) : aucune fluorescence n'a été constatée dans ces canaux.

Dans les conditions de PCR triplex, l'amplification de tous les points de la gamme *intI2*, de 10⁸ à 10¹ copies, s'opère et n'est en fait que peu affectée par la présence des autres couples d'amorces et de sondes. Aucun signal de fluorescence n'est émis dans les canaux des sondes *intI1* (FAM) et *intI3* (Cy3), preuve de l'absence de réactions croisées de ces dernières avec l'amplification du gène *intI2*.

Les résultats des trois essais de PCR triplex avec la gamme *intI2* sont résumés dans le tableau 11. La figure 43 représente la droite $C_t = f(\log[*intI2*])$. Elle a été tracée après calcul de la moyenne des C_t des trois essais effectués.

Gamme <i>intI2</i> (copies)	PCR Triplex			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
1,00E+08	13,11	13,81	13,38	13,43	0,35
1,00E+07	17,36	17,50	16,99	17,28	0,26
1,00E+06	20,49	20,51	19,98	20,33	0,30
1,00E+05	24,11	24,51	23,47	24,03	0,52
1,00E+04	27,77	27,60	26,63	27,33	0,62
1,00E+03	30,37	30,14	29,97	30,16	0,20
1,00E+02	34,64	34,44	33,49	34,19	0,61
1,00E+01	37,26	37,83	37,57	37,55	0,29
Pente	-3,461	-3,313	-3,296	-3,357	
Ordonnée à l'origine	41,24	40,57	39,86	40,56	
Efficacité	94%	100%	101%	99%	
R ²	0,9966	0,9964	0,9996	0,9983	

Tableau 11 : PCR triplex *intI2*. C_t obtenus lors des essais 1, 2 et 3.

Pour chaque essai mené, la pente de la droite C_t = f(log[*intI2*]), l'efficacité, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation ont été calculés en prenant en compte les points 10⁸ à 10³ copies. L'efficacité moyenne de la réaction (fond jaune) a été calculée à partir des C_t moyens correspondants aux points 10⁸ à 10³ copies.

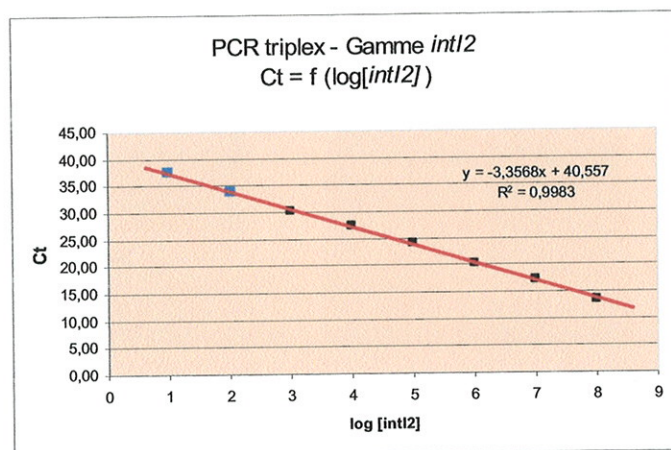


Figure 43 : PCR triplex. C_t = f (log[*intI2*])

Cette courbe a été tracée en tenant compte de la moyenne des C_t obtenus au cours des trois expérimentations. L'équation de la droite tient compte des points 10⁸ à 10³ copies. Les points 10¹ et 10² copies ont été rajoutés en bleu sur la courbe.

Les résultats montrent une très bonne reproductibilité des valeurs de C_t avec, qui plus est, une efficacité moyenne de 99%. Les C_t sont à peine décalés par rapport à ceux obtenus pour des points identiques en condition de PCR simplex.

Lorsque le gène *intI2* est seul présent dans un mélange réactionnel, il est donc possible dans des conditions de PCR multiplex, de détecter de façon reproductible, jusqu'à 10¹ copies de ce gène, sans que les amorces et sondes dédiées aux amplifications des gènes *intI1* et *intI3* ne perturbent l'efficacité de la réaction.

○ Gamme *intI3* seule

La figure 44 illustre le type de courbes obtenues à l'issue d'une PCR triplex du gène *intI3*.

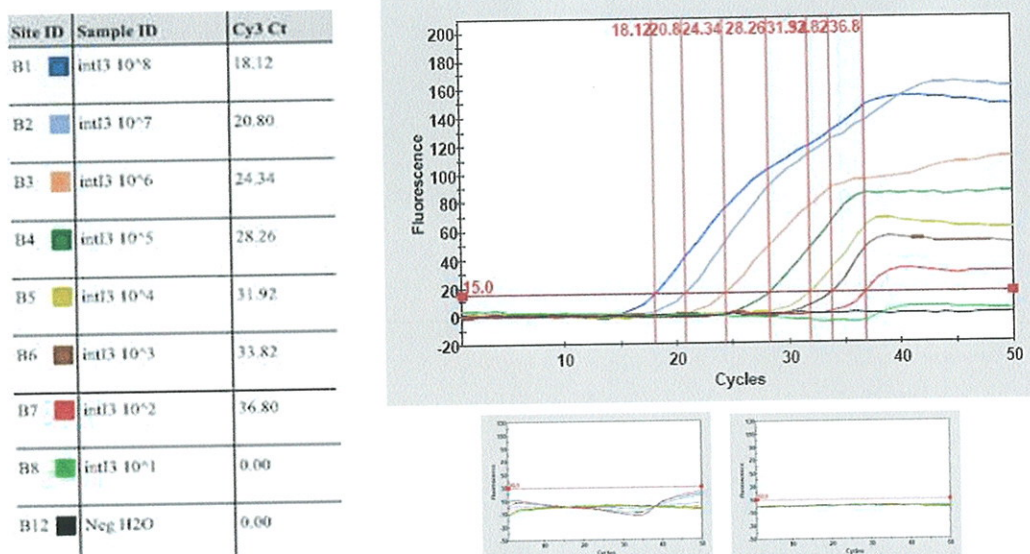


Figure 44 : PCR triplex. Gamme *intI3* 10⁸ à 10¹ copies.

Chaque courbe colorée représente l'amplification d'un point de la gamme *pBAD::intI3*. L'amplification est assurée du point 10⁸ copies ($C_t = 18,12$) au point 10² copies ($C_t = 36,80$). La courbe noire représente le témoin négatif (eau). Le seuil de fluorescence a été fixé à 15.

Les deux autres tracés représentent les canaux de lecture des sondes *intI1* (FAM) et *intI2* (TexasRed) : aucune fluorescence n'a été constatée dans ces canaux.

Dans les conditions de PCR triplex, l'amplification des points de la gamme *intI3* s'opère de 10⁸ à 10² copies. Aucun des essais menés n'a permis de détecter le point 10¹ copies. Dans des conditions de PCR triplex, la sensibilité de la réaction vis-à-vis du gène *intI3*, lorsque celui-ci est seul présent, est moindre ; elle se limite à la détection de 10² copies. Néanmoins, outre une amplification visiblement moins bonne, il ne faut pas oublier que le seuil du canal Cy3 a été relevé à 15 unités de fluorescence dans les conditions triplex en raison de l'émission parasite de FAM dans ce canal. Il en découle une meilleure spécificité, mais en contrepartie une sensibilité moindre et des C_t allongés.

Cependant, aucun signal de fluorescence n'est émis dans les canaux des sondes *intI1* (FAM) et *intI2* (TexasRed), preuve de l'absence de croisement de ces dernières avec l'amplification du gène *intI3*.

Les résultats des trois essais de PCR triplex avec la gamme *intI3* sont résumés dans le tableau 12. La figure 45 représente la droite $C_t = f(\log[\textit{intI3}])$. Elle a été tracée après calcul de la moyenne des C_t des trois essais effectués.

Gamme <i>intI3</i> (copies)	PCR Triplex			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
1,00E+08	18,64	18,12	17,85	18,20	0,40
1,00E+07	19,88	20,80	20,19	20,29	0,47
1,00E+06	23,62	24,34	23,62	23,86	0,42
1,00E+05	30,07	28,26	27,63	27,95	0,45
1,00E+04	30,77	31,92	31,43	31,37	0,58
1,00E+03	34,16	33,82	33,19	33,72	0,49
1,00E+02	38,97	36,80	36,60	37,46	1,31
1,00E+01	-	-	-	-	-
Pente	-3,258	-3,308	-3,269	-3,284	
Ordonnée à l'origine	43,66	44,40	43,63	43,96	
Efficacité	103%	101%	102%	102%	
R ²	0,9872	0,9926	0,9900	0,9921	

Tableau 11 : PCR triplex *intI3*. C_t obtenus lors des essais 1, 2 et 3.

Pour chaque essai mené, la pente de la droite $C_t = f(\log[\textit{intI3}])$, l'efficacité, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation ont été calculés en prenant en compte les points 10⁸ à 10³ copies. L'efficacité moyenne de la réaction (fond jaune) a été calculée à partir des C_t moyens correspondants aux points 10⁸ à 10³ copies. Le C_t du point 10⁵ de l'essai 1 n'a pas été pris en compte dans les calculs.

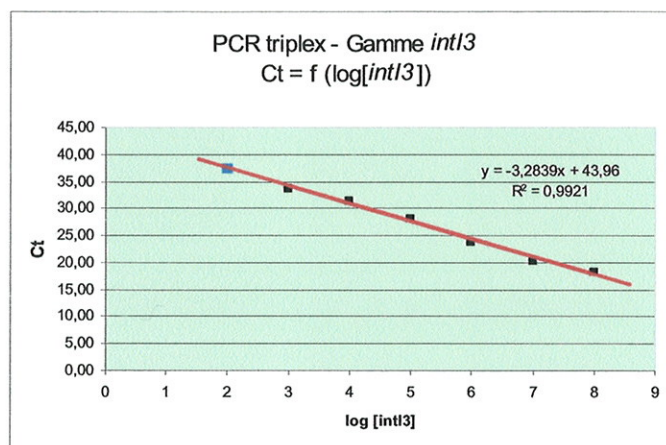


Figure 45 : PCR triplex. C_t = f(log[*intI3*])

Cette courbe a été tracée en tenant compte de la moyenne des C_t obtenus au cours des trois expérimentations. L'équation de la droite tient compte des points 10⁸ à 10³ copies. Le point 10² copies a été rajouté en bleu sur la courbe.

Malgré une sensibilité de « seulement » 10² copies, les résultats montrent une très bonne reproductibilité des valeurs de C_t et l'efficacité moyenne de la réaction reste proche de 100 %. Les C_t sont très décalés par rapport à ceux obtenus pour des points identiques en condition de PCR simplex, notamment en raison du seuil de Cy3 rehaussé.

Lorsque le gène *intI3* est seul présent dans un mélange réactionnel, il est donc possible dans des conditions de PCR multiplex, de détecter de façon reproductible jusqu'à 10² copies de ce gène, sans que les amorces et les sondes dédiées aux amplifications des gènes *intI1* et *intI2* ne perturbent l'efficacité de la réaction.

▪ Gammes croisées de deux gènes

○ Gamme croisée *intI1* / *intI2*

Les résultats de la moyenne des C_t obtenus à l'issue des deux essais sont représentés dans les tableaux 13A et 13B.

Moyenne des C_t des 2 essais		<i>intI2</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI1</i>	1,00E+07	18,71	18,64	19,00	18,83	18,84	0,14
	1,00E+05	25,85	25,15	25,26	25,77	25,61	0,31
	1,00E+03	33,20	32,90	32,40	32,38	32,93	0,36
	1,00E+02	36,65	35,21	36,95	37,25	37,10	0,83
	1,00E+01	39,15	40,00	-	38,72	39,42	0,54
Pente		-3,623	-3,566	-3,351	-3,389	-3,524	
Ordonnée à l'origine		44,03	43,39	42,31	42,60	43,41	
Efficacité		89%	91%	99%	97%	92%	
A.	R^2	0,9999	0,9975	0,9985	0,9998	0,9995	

Moyenne des C_t des 2 essais		<i>intI1</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI2</i>	1,00E+07	16,96	17,25	17,22	17,22	17,31	0,13
	1,00E+05	24,29	24,03	24,35	23,89	24,16	0,19
	1,00E+03	31,10	30,78	31,15	31,21	31,03	0,17
	1,00E+02	35,17	34,81	34,28	34,25	34,93	0,41
	1,00E+01	38,53	39,01	38,79	38,91	40,12	0,61
Pente		-3,535	-3,384	-3,484	-3,499	-3,430	
Ordonnée à l'origine		41,79	40,94	41,66	41,60	41,31	
Efficacité		92%	97%	94%	93%	96%	
B.	R^2	0,9995	1,0000	0,9998	0,9993	1,0000	

Tableau 13 : PCR triplex. Gammes croisées *intI1* + *intI2*. Moyenne des C_t obtenus lors des essais 1 et 2.

A. Ce tableau représente la moyenne des C_t obtenus pour l'amplification des points 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10^1 de la gamme *intI1* (fond bleu) en fonction des concentrations en gène *intI2* (fond saumon). Les valeurs surlignées en bleu foncé correspondent aux points de gamme amplifiés seulement lors de l'un des deux essais.

B. Ce tableau représente la moyenne des C_t obtenus pour l'amplification des points 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10^1 de la gamme *intI2* (fond saumon) en fonction des concentrations en gène *intI1* (fond bleu). Les valeurs surlignées en orange correspondent aux points de gamme amplifiés seulement lors de l'un des deux essais.

L'efficacité de chaque gamme a été calculée à partir des C_t des points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies. Les points 10^1 et 10^2 permettent d'évaluer la sensibilité de la réaction. L'écart-type (fond jaune) permet de montrer la dispersion d'un même point de gamme selon la concentration de l'autre gène. Aucun signal de fluorescence parasite n'a été noté dans le canal Cy3 (sonde *intI3*).

▪ Sensibilité *intI1* :

Quelle que soit la quantité du gène *intI2* présente, les points de gamme 10^7 à 10^2 copies du gène *intI1* sont amplifiés. Par contre, lorsque cette quantité passe à 10^1 copies, des difficultés, voire des échecs d'amplification sont observés : en présence de 10^3 copies d'*intI2*, l'amplification d'*intI1* a échoué par deux fois, elle n'a fonctionné qu'une fois sur deux lorsqu'*intI2* était présent à 10^2 et 10^1 copies. Il semble donc que pour ce faible nombre de

copies d'*intI1* (10^1), l'amplification du gène soit aléatoire, et ce quelle que soit la quantité d'*intI2* présente. Ces résultats suggèrent de positionner le seuil de détection du gène *intI1* à 10^2 copies lorsqu'une amplification a lieu lors de la même expérimentation avec le gène *intI2*.

▪ Reproductibilité, efficacité *intI1* :

Bien que non représentés, les écarts-types des mêmes points lors des deux essais menés sont très faibles, inférieurs à 0,3 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 d'*intI1*, et ce, quelle que soit la quantité d'*intI2*. Pour les points à 10^2 copies, ils restent inférieurs à 0,6. Ces données montrent une très bonne reproductibilité de la réaction.

Par ailleurs, la quantité d'*intI2* présente influe peu sur l'amplification d'*intI1* : les écarts-types entre les points ayant les mêmes concentrations en *intI1*, mais des concentrations variables en *intI2*, restent inférieurs à 0,4 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies d'*intI1*.

Globalement, quelle que soit la quantité du gène *intI2* présente, l'efficacité de la réaction de PCR *intI1* reste bonne. Seules les fortes concentrations en *intI2* (10^7 et 10^5 copies) semblent diminuer l'efficacité de la réaction qui atteint tout de même une valeur de 90 %.

▪ Sensibilité *intI2* :

Le comportement de la PCR *intI2* est à l'image de celui observé avec la PCR *intI1*. Pour les points 10^7 à 10^2 copies d'*intI2*, aucun échec d'amplification n'apparaît ; par contre, pour le point 10^1 copies, l'amplification échoue parfois. Il convient donc là aussi de positionner le seuil de détection du gène *intI2* à 10^2 copies lorsqu'une amplification a lieu lors de la même expérimentation avec le gène *intI1*.

▪ Reproductibilité, efficacité *intI2* :

Comme avec *intI1*, les écarts-types des mêmes points lors des deux essais menés sont très faibles, inférieurs à 0,3 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 d'*intI2*, et ce, quelle que soit la quantité d'*intI1*. Pour les points à 10^2 copies, ils sont même meilleurs comparés à ceux du gène *intI1*, atteignant au maximum un écart-type de 0,32. Ces données montrent une très bonne reproductibilité de la réaction.

Par ailleurs, la quantité d'*intI1* présente influe peu sur l'amplification d'*intI2* : les écarts-types entre les points ayant les mêmes concentrations en *intI2*, mais des concentrations variables en *intI1*, restent inférieurs à 0,2 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies d'*intI2*.

Globalement, quelle que soit la quantité du gène *intI1* présente, même 10^7 copies, l'efficacité de la réaction de PCR *intI2* reste très bonne, toujours supérieure à 92 %.

En conclusion, si dans un même milieu réactionnel exempt du gène *intI3*, les gènes *intI1* et *intI2* sont présents, il est possible *via* la PCR en temps réel multiplex développée, de détecter jusqu'à 10^2 copies de l'un ou l'autre des gènes, et ce, quelle que soit la concentration d'un gène par rapport à l'autre. Dans ces conditions, la réaction a été validée pour une gamme de concentrations en gènes *intI1* et *intI2* allant de 10^8 à 10^2 copies pour 5 μ L d'échantillon.

o Gamme croisée *intI2* / *intI3*

Les résultats de la moyenne des C_t obtenus à l'issue des deux essais sont représentés dans les tableaux 14A et 14B.

Moyenne des C_t des 2 essais		<i>intI3</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI2</i>	1,00E+07	17,35	17,48	17,32	17,72	16,98	0,27
	1,00E+05	24,72	24,73	24,70	24,68	24,36	0,16
	1,00E+03	31,31	31,51	31,62	31,41	31,72	0,16
	1,00E+02	35,24	34,59	35,15	34,73	34,49	0,34
	1,00E+01	39,91	38,47	40,01	37,64	-	-
Pente		-3,491	-3,508	-3,575	-3,423	-3,686	
Ordonnée à l'origine		41,91	42,11	42,42	41,71	42,78	
Efficacité		93%	93%	90%	96%	87%	
A.	R^2	0,9989	0,9996	0,9996	0,9999	1,0000	

Moyenne des C_t des 2 essais		<i>intI2</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI3</i>	1,00E+07	21,26	21,50	21,25	21,45	21,37	0,11
	1,00E+05	27,65	27,75	28,08	27,51	27,35	0,27
	1,00E+03	34,70	34,25	34,55	34,48	34,29	0,18
	1,00E+02	38,80	37,24	37,22	37,07	37,39	0,71
	1,00E+01	40,17	-	-	-	-	-
Pente		-3,359	-3,189	-3,325	-3,259	-3,231	
Ordonnée à l'origine		44,66	43,77	44,58	44,11	43,82	
Efficacité		98%	106%	100%	103%	104%	
B.	R^2	0,9992	0,9999	0,9998	0,9984	0,9982	

Tableau 14 : PCR triplex. Gammes croisées *intI2* + *intI3*. Moyenne des C_t obtenus lors des essais 1 et 2.

- A. Ce tableau représente la moyenne des C_t obtenus pour l'amplification des points 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10^1 de la gamme *intI2* (fond saumon) en fonction des concentrations en gène *intI3* (fond vert). Les valeurs surlignées en orange correspondent aux points de gamme amplifiés seulement lors de l'un des deux essais.
- B. Ce tableau représente la moyenne des C_t obtenus pour l'amplification des points 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10^1 de la gamme *intI3* (fond vert) en fonction des concentrations en gène *intI2* (fond saumon). Les valeurs surlignées en vert foncé correspondent aux points de gamme amplifiés seulement lors de l'un des deux essais.

L'efficacité de chaque gamme a été calculée à partir des C_t des points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies. Les points 10^1 et 10^2 permettent d'évaluer la sensibilité de la réaction. L'écart-type (fond jaune) permet de montrer la dispersion d'un même point de gamme selon la concentration de l'autre gène. Aucun signal de fluorescence parasite n'a été noté dans le canal FAM (sonde *intI1*).

▪ Sensibilité *intI2* :

Quelle que soit la quantité du gène *intI3* présente, les points de gamme 10^7 à 10^2 copies du gène *intI2* sont amplifiés. Par contre, l'amplification du point 10^1 copies est aléatoire, et ce quelle que soit la quantité d'*intI3* présente. Ces résultats suggèrent de positionner le seuil de détection du gène *intI2* à 10^2 copies lorsqu'une amplification a lieu lors de la même expérimentation avec le gène *intI3*.

▪ Reproductibilité, efficacité *intI2* :

Bien que non représentés, les écarts-types des mêmes points lors des deux essais menés sont très faibles, inférieurs à 0,4 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 d'*intI2*, et ce, quelle que soit la quantité d'*intI3*. Pour les points à 10^2 copies, ils restent inférieurs à 0,85. Ces données montrent une très bonne reproductibilité de la réaction.

Par ailleurs, la quantité d'*intI3* présente influe peu sur l'amplification d'*intI2* : les écarts-types entre les points ayant les mêmes concentrations en *intI2*, mais des concentrations variables en *intI3*, restent inférieurs à 0,3 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies d'*intI2*.

Quelle que soit la quantité du gène *intI3* présente, y compris lorsque celui-ci est présent à de fortes concentrations, l'efficacité de la réaction de PCR *intI2* est proche de 90 %.

▪ Sensibilité *intI3* :

Pour les points 10^7 à 10^2 copies d'*intI2*, aucun échec d'amplification du gène *intI3* n'apparaît ; par contre, pour le point 10^1 copies, l'amplification échoue quasi-systématiquement. Il convient donc de positionner le seuil de détection du gène *intI3* à 10^2 copies lorsqu'une amplification a lieu lors de la même expérimentation avec le gène *intI2*.

▪ Reproductibilité, efficacité *intI3* :

Les écarts-types des mêmes points lors des deux essais menés sont très faibles, inférieurs à 0,6 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 d'*intI3*, et ce, quelle que soit la quantité d'*intI2*. Pour les points à 10^2 copies, la dispersion est plus grande, notamment quand *intI2* est présent à de fortes concentrations. Ces données montrent une très bonne reproductibilité de la réaction.

Par ailleurs, la quantité d'*intI2* présente influe peu sur l'amplification d'*intI3* : les écarts-types entre les points ayant les mêmes concentrations en *intI3*, mais des concentrations variables en *intI2*, restent inférieurs à 0,3 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies d'*intI3*. Quelle que soit la quantité du gène *intI2* présente, même 10^7 copies, l'efficacité de la réaction de PCR *intI3* reste très bonne, aux alentours de 100 %.

En conclusion, si dans un même milieu réactionnel exempt du gène *intI1*, les gènes *intI2* et *intI3* sont présents, il est possible *via* la PCR en temps réel multiplex développée, de détecter jusqu'à 10^2 copies de l'un ou l'autre des gènes, et ce, quelle que soit la concentration d'un gène par rapport à l'autre. Dans ces conditions, la réaction a été validée pour une gamme de concentrations en gènes *intI1* et *intI2* allant de 10^8 à 10^2 copies pour 5 μ L d'échantillon.

○ Gamme croisée *intI1* / *intI3*

Les résultats de la moyenne des C_t obtenus à l'issue des deux essais sont représentés dans les tableaux 15A et 15B.

Moyenne des C_t des 2 essais		<i>intI3</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI1</i>	1,00E+07	18,77	18,57	18,57	18,87	18,43	0,18
	1,00E+05	25,71	25,70	25,94	26,16	25,52	0,25
	1,00E+03	32,07	31,67	31,46	31,38	31,46	0,28
	1,00E+02	36,60	35,99	37,37	35,78	36,04	0,64
	1,00E+01	39,73	40,33	43,73	37,64	38,61	2,32
Pente		-3,324	-3,275	-3,223	-3,129	-3,259	
Ordonnée à l'origine		42,13	41,69	41,43	41,11	41,43	
Efficacité		100%	102%	104%	109%	103%	
A.	R^2	0,9994	0,9974	0,9932	0,9909	0,9974	

Moyenne des C_t des 2 essais		<i>intI1</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI3</i>	1,00E+07	20,52	20,78	21,10	20,57	20,66	0,23
	1,00E+05	25,28	27,99	27,60	27,49	27,49	1,08
	1,00E+03	34,96	32,86	33,54	33,72	33,96	0,76
	1,00E+02	-	36,04	35,95	36,90	37,58	0,77
	1,00E+01	-	-	-	-	-	-
Pente		-3,609	-3,019	-3,109	-3,288	-3,325	
Ordonnée à l'origine		44,96	42,30	42,96	43,69	43,99	
Efficacité		89%	114%	110%	101%	100%	
B.	R^2	0,9626	0,9877	0,9993	0,9991	0,9998	

Tableau 15 : PCR triplex. Gammes croisées *intI1* + *intI3*. Moyenne des C_t obtenus lors des essais 1 et 2.

- A. Ce tableau représente la valeur des C_t obtenus pour l'amplification des points 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10^1 de la gamme *intI1* (fond bleu clair) en fonction des concentrations en gène *intI3* (fond vert clair). Les valeurs surlignées en bleu foncé correspondent aux points de gamme amplifiés seulement lors de l'un des deux essais.
- B. Ce tableau représente la valeur des C_t obtenus pour l'amplification des points 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10^1 de la gamme *intI3* (fond vert clair) en fonction des concentrations en gène *intI1* (fond bleu).

L'efficacité de chaque gamme a été calculée à partir des C_t des points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies. Les points 10^1 et 10^2 permettent d'évaluer la sensibilité de la réaction. L'écart-type (fond jaune) permet de montrer la dispersion d'un même point de gamme selon la concentration de l'autre gène. Aucun signal de fluorescence parasite n'a été noté dans le canal TexasRed (sonde *intI2*).

▪ Sensibilité *intI1* :

Quelle que soit la quantité du gène *intI3* présente, les points de gamme 10^7 à 10^2 copies du gène *intI1* sont amplifiés. Par contre, l'amplification des points 10^1 copies est aléatoire, et ce quelle que soit la quantité d'*intI3* présente. Ces résultats suggèrent de positionner le seuil de détection du gène *intI1* à 10^2 copies lorsqu'une amplification a lieu lors de la même expérimentation avec le gène *intI3*.

▪ Reproductibilité, efficacité *intI1* :

Les écarts-types des mêmes points lors des deux essais menés restent inférieurs à 0,5 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 d'*intI2*, et ce, quelle que soit la quantité d'*intI3*. Par contre, pour les points à 10^2 copies, ils sont plus importants, parfois supérieur à 1,5. Ces données montrent une bonne reproductibilité de la réaction pour les points à 10^7 , 10^5 et 10^3 copies d'*intI1*. En deçà, l'amplification s'effectue, mais avec des variations en C_t plus importantes.

Par ailleurs, pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies d'*intI1*, la quantité d'*intI3* présente influe peu, les écarts-types entre les points ayant les mêmes concentrations en *intI1*, mais des concentrations variables en *intI3*, restant inférieurs à 0,3.

Quelle que soit la quantité du gène *intI3* présente, y compris lorsque celui-ci est présent à de fortes concentrations, l'efficacité de la réaction de PCR *intI1* est très bonne, aux alentours de 100 %.

▪ Sensibilité *intI3* :

Quelle que soit la quantité du gène *intI1* présente, les points de gamme 10^7 à 10^3 copies du gène *intI3* sont amplifiés. Quand le gène *intI3* est présent à 10^2 copies, l'amplification s'effectue, excepté lorsque le gène *intI1* est présent à 10^7 copies. Il convient donc de positionner le seuil de détection du gène *intI3* à 10^2 copies lorsqu'une amplification a lieu lors de la même expérimentation avec le gène *intI1*, sauf quand celui-ci est présent à raison de 10^7 copies.

▪ Reproductibilité, efficacité *intI3* :

Les écarts-types des mêmes points lors des deux essais menés sont plus élevés que dans les autres essais de gammes croisées, mais restent tout de même inférieurs à 0,75 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 d'*intI3*, et ce, quelle que soit la quantité d'*intI1*. Par ailleurs, la quantité d'*intI1* présente influe légèrement sur l'amplification de certains points d'*intI3* ; ceci est particulièrement flagrant pour les points *intI3* 10^3 et 10^5 quand *intI1* est égal à 10^7 . Les

écarts-types entre les points ayant les mêmes concentrations en *intI3*, mais des concentrations variables en *intI1*, dépassent ainsi la valeur de 1 pour le point 10^5 . Ces données expliquent une efficacité d'amplification du gène *intI3* inférieure à 90 % lorsqu'*intI1* est présent à 10^7 copies. Pour le reste, les efficacités restent aux alentours de 100 %.

En conclusion, si dans un même milieu réactionnel exempt du gène *intI2*, les gènes *intI1* et *intI3* sont présents, il est possible *via* la PCR en temps réel multiplex développée, de détecter jusqu'à 10^2 copies du gène *intI1* ; la sensibilité du gène *intI3* est elle aussi évaluée à 10^2 copies, mais elle doit être rehaussée à 10^3 copies lorsque le gène *intI1* est présent à raison de 10^7 copies.

- Gammes croisées des gènes *intI1* et *intI2* en présence d'une quantité fixe du gène *intI3*

Les tableaux suivants montrent les résultats obtenus lors des essais de gammes croisées *intI1* / *intI2*, en présence de concentrations fixes du gène *intI3*. Les tableaux 16A à 16E concernent les résultats du gène *intI1*.

		<i>intI2</i>					Ecart type
		<i>intI3</i> 10^1	1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	
<i>intI1</i>	1,00E+07	19,76	19,42	19,81	19,55	19,41	0,19
	1,00E+05	26,05	26,18	26,39	26,32	26,26	0,13
	1,00E+03	32,80	33,45	33,37	33,29	33,13	0,26
	1,00E+02	36,09	38,92	37,17	37,42	35,60	1,29
	1,00E+01	37,51	-	-	-	-	-
Pente		-3,260	-3,508	-3,390	-3,435	-3,430	
Ordonnée à l'origine		42,50	43,89	43,47	43,56	43,42	
Efficacité		103%	93%	97%	95%	96%	
A.	R ²	0,9996	0,9996	0,9997	0,9999	1,0000	

		<i>intI2</i>					Ecart type
		<i>intI3</i> 10^2	1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	
<i>intI1</i>	1,00E+07	19,17	19,07	19,09	19,29	19,12	0,09
	1,00E+05	25,75	26,06	25,97	26,11	26,18	0,17
	1,00E+03	32,50	33,04	33,32	33,14	32,91	0,31
	1,00E+02	36,87	38,03	36,18	36,67	36,35	0,73
	1,00E+01	39,18	-	-	-	39,36	-
Pente		-3,333	-3,493	-3,558	-3,463	-3,448	
Ordonnée à l'origine		42,47	43,52	43,91	43,49	43,31	
Efficacité		100%	93%	91%	94%	95%	
B.	R ²	0,9999	1,0000	0,9996	0,9999	0,9998	

		intI2					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
intI1	intI3 10 ³	1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
	1,00E+07	18,59	18,10	18,30	18,40	18,08	0,21
	1,00E+05	25,07	25,34	25,21	25,39	25,58	0,19
	1,00E+03	32,09	32,21	32,57	32,48	32,21	0,20
	1,00E+02	35,24	36,17	36,56	35,60	36,91	0,68
	1,00E+01	42,14	39,78	37,38	38,23	39,95	-
Pente		-3,375	-3,528	-3,568	-3,520	-3,533	
Ordonnée à l'origine		42,13	42,85	43,20	43,02	42,95	
Efficacité		98%	92%	91%	92%	92%	
C.	R ²	0,9995	0,9998	0,9997	1,0000	0,9987	

		intI2					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
intI1	intI3 10 ⁵	1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
	1,00E+07	19,15	18,80	18,96	18,84	18,96	0,14
	1,00E+05	25,64	25,80	25,71	25,84	25,83	0,09
	1,00E+03	33,11	32,98	33,53	32,86	32,99	0,26
	1,00E+02	35,87	43,67	36,03	35,75	35,80	0,12
	1,00E+01	40,84	-	-	41,70	42,91	-
Pente		-3,490	-3,545	-3,643	-3,505	-3,508	
Ordonnée à l'origine		43,42	43,59	44,28	43,37	43,46	
Efficacité		93%	91%	88%	93%	93%	
D.	R ²	0,9984	0,9999	0,9982	1,0000	0,9999	

		intI2					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
intI1	intI3 10 ⁷	1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
	1,00E+07	18,51	18,38	18,44	18,23	18,18	0,14
	1,00E+05	25,19	25,41	25,35	25,41	25,71	0,19
	1,00E+03	33,38	33,10	32,67	32,49	32,74	0,36
	1,00E+02	37,74	38,74	37,34	37,67	36,05	0,97
	1,00E+01	-	-	39,57	-	-	-
Pente		-3,718	-3,680	-3,558	-3,565	-3,640	
Ordonnée à l'origine		44,28	44,03	43,27	43,20	43,74	
Efficacité		86%	87%	91%	91%	88%	
E.	R ²	0,9966	0,9993	0,9997	1,0000	0,9996	

Tableaux 16 (A à E) : PCR triplex. Gammes croisées *intI1* + *intI2*, en présence de quantités fixes d'*intI3*.

Résultats des C_t des points de gamme *intI1*.

Ces tableaux indiquent les C_t obtenus lors de l'amplification des points de gamme 10⁷, 10⁵, 10³, 10² et 10¹ du gène *intI1* (fond bleu) en présence d'une gamme du gène *intI2* (10⁷, 10⁵, 10³, 10² et 10¹, fond saumon) et de quantités fixes du gène *intI3* (fond vert). Dans le tableau A, la quantité fixe d'*intI3* est de 10¹ copies, elle augmente ensuite à 10², 10³, 10⁵ et enfin 10⁷ copies (tableaux B à E).

L'efficacité de chaque gamme a été calculée à partir des C_t des points 10⁷, 10⁵ et 10³ copies. Les points 10¹ et 10² permettent d'évaluer la sensibilité de la réaction. L'écart-type (fond jaune) permet de montrer la dispersion d'un même point de gamme selon la concentration du gène *intI2*.

NB : Le C_t du point surligné en rouge dans le tableau 16D n'a pas été pris en compte dans le calcul de l'écart-type.

▪ Sensibilité *intI1* :

Les points de gamme testés allant de 10⁷ à 10² copies ont tous pu être amplifiés, quelle que soit la quantité d'*intI2* présente, et ce malgré la présence supplémentaire du gène *intI3*. Pour le point *intI1* à 10¹ copies, l'amplification n'est pas systématique. Il convient donc de fixer la sensibilité du gène *intI1* à 10² copies lorsque les deux autres gènes sont présents dans le milieu réactionnel.

▪ Efficacité *intI1* :

La quantité d'*intI2* et d'*intI3* présente influe peu sur l'amplification des points d'*intI1*, les écarts-types entre les points ayant les mêmes concentrations en *intI1*, mais des concentrations variables en *intI2* restant inférieurs à 0,4 pour les points 10^7 , 10^5 et 10^3 copies d'*intI1*.

L'efficacité de la réaction d'amplification du gène *intI1* diminue quelque peu au fur et à mesure que la quantité d'*intI3* augmente, passant en deçà de 90 %, lorsque la quantité d'*intI3* est de 10^7 copies. Les valeurs restent néanmoins tout à fait acceptables pour une réaction de PCR en temps réel triplex.

Les tableaux 17A à 17E concernent les résultats obtenus avec l'amplification des points de gamme *intI2*.

		<i>intI1</i>					
<i>intI3</i> 10^1		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	Ecart type
<i>intI2</i>	1,00E+07	18,16	17,15	17,10	17,07	17,22	0,46
	1,00E+05	23,76	24,22	24,20	24,20	24,23	0,20
	1,00E+03	31,19	31,40	31,66	31,42	31,36	0,17
	1,00E+02	34,25	34,81	34,72	34,84	34,53	0,24
	1,00E+01	38,89	39,92	37,55	40,62	37,76	-
Pente		-3,258	-3,563	-3,640	-3,588	-3,535	
Ordonnée à l'origine		40,66	42,07	42,52	42,17	41,95	
Efficacité		103%	91%	88%	90%	92%	
A.	R ²	0,9935	1,0000	0,9998	1,0000	1,0000	

		<i>intI1</i>					
<i>intI3</i> 10^2		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	Ecart type
<i>intI2</i>	1,00E+07	16,93	17,08	16,87	16,90	17,12	0,11
	1,00E+05	23,97	24,22	23,87	23,86	23,81	0,16
	1,00E+03	31,16	30,79	31,30	31,28	31,06	0,21
	1,00E+02	34,74	34,43	34,30	35,04	34,44	0,30
	1,00E+01	39,32	-	37,75	39,49	40,14	-
Pente		-3,558	-3,428	-3,608	-3,595	-3,485	
Ordonnée à l'origine		41,81	41,17	42,05	41,99	41,42	
Efficacité		91%	96%	89%	90%	94%	
B.	R ²	1,0000	0,9994	0,9997	0,9997	0,9995	

		<i>intI1</i>					
<i>intI3</i> 10^3		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	Ecart type
<i>intI2</i>	1,00E+07	17,44	16,81	16,73	16,54	16,62	0,36
	1,00E+05	23,50	24,13	23,78	23,74	23,86	0,23
	1,00E+03	31,32	30,89	31,18	31,26	31,19	0,17
	1,00E+02	34,06	34,79	34,42	34,71	34,56	0,29
	1,00E+01	38,77	36,94	-	-	37,50	-
Pente		-3,470	-3,520	-3,613	-3,680	-3,643	
Ordonnée à l'origine		41,44	41,54	41,96	42,25	42,10	
Efficacité		94%	92%	89%	87%	88%	
C.	R ²	0,9947	0,9995	0,9998	0,9998	1,0000	

		<i>intI1</i>					Ecart type
		<i>intI3</i> 10 ⁵	1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	
<i>intI2</i>	1,00E+07	17,38	16,72	16,52	16,68	16,60	0,34
	1,00E+05	23,57	23,94	23,87	23,58	23,95	0,19
	1,00E+03	31,13	31,17	31,75	31,03	30,60	0,41
	1,00E+02	35,13	35,18	34,49	34,29	35,11	0,42
	1,00E+01	39,92	-	37,75	40,55	38,67	-
Pente		-3,438	-3,613	-3,808	-3,588	-3,500	
Ordonnée à l'origine		41,21	42,01	43,08	41,70	41,22	
Efficacité		95%	89%	83%	90%	93%	
D.	R ²	0,9967	1,0000	0,9996	0,9995	0,9992	

		<i>intI1</i>					Ecart type
		<i>intI3</i> 10 ⁷	1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	
<i>intI2</i>	1,00E+07	17,15	16,58	16,46	16,62	16,54	0,27
	1,00E+05	23,74	23,94	23,51	23,60	23,67	0,16
	1,00E+03	31,62	30,74	31,53	30,84	31,24	0,40
	1,00E+02	35,86	35,25	34,15	34,99	34,88	0,62
	1,00E+01	40,55	-	41,26	-	-	-
Pente		-3,618	-3,540	-3,768	-3,555	-3,675	
Ordonnée à l'origine		42,26	41,45	42,67	41,46	42,19	
Efficacité		89%	92%	84%	91%	87%	
E.	R ²	0,9974	0,9995	0,9986	0,9999	0,9997	

Tableaux 17 (A à E) : PCR triplex. Gammes croisées *intI1* + *intI2*, en présence de quantités fixes d'*intI3*. Résultats des C_t des points de gamme *intI2*.

Ces tableaux indiquent les C_t obtenus lors de l'amplification des points de gamme 10⁷, 10⁵, 10³, 10² et 10¹ du gène *intI2* (fond saumon) en présence d'une gamme du gène *intI1* (10⁷, 10⁵, 10³, 10² et 10¹, fond bleu) et de quantités fixes du gène *intI3* (fond vert). Dans le tableau A, la quantité fixe d'*intI2* est de 10¹ copies, elle augmente ensuite à 10², 10³, 10⁵ et enfin 10⁷ copies (tableaux B à E).

L'efficacité de chaque gamme a été calculée à partir des C_t des points 10⁷, 10⁵ et 10³ copies. Les points 10¹ et 10² permettent d'évaluer la sensibilité de la réaction. L'écart-type (fond jaune) permet de montrer la dispersion d'un même point de gamme selon la concentration du gène *intI1*.

▪ Sensibilité *intI2* :

Les résultats sont comparables avec ceux concernant le gène *intI1*. Les points de gamme testés allant de 10⁷ à 10² copies ont tous pu être amplifiés, quelle que soit la quantité d'*intI1* présente, mais aussi malgré la présence supplémentaire du gène *intI3*. Pour le point *intI2* 10¹ copies, l'amplification n'est pas systématique. Il convient donc de fixer la sensibilité du gène *intI2* à 10² copies lorsque les deux autres gènes sont présents dans le milieu réactionnel.

▪ Efficacité *intI2* :

La quantité d'*intI1* et d'*intI3* présente influe peu sur l'amplification des points d'*intI2*, les écarts-types entre les points ayant les mêmes concentrations en *intI2*, mais des concentrations variables en *intI1* restant inférieurs à 0,5 pour les points 10⁷, 10⁵ et 10³ copies d'*intI2*.

L'efficacité de la réaction d'amplification du gène *intI2* est globalement située aux alentours de 90 %. Il ne semble pas apparaître de baisse significative de l'efficacité lorsque la quantité du gène *intI3* est de 10^7 copies. Globalement, les valeurs sont tout à fait acceptables pour une réaction de PCR en temps réel multiplex.

Les tableaux 18A à 18E concernent les C_t obtenus avec l'amplification des points de gamme *intI3*. Chaque tableau indique les C_t obtenus pour une seule et même concentration du gène *intI3*.

<i>intI3</i> 10^1		<i>intI2</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI1</i>	1,00E+07	-	-	-	-	-	-
	1,00E+05	-	-	-	-	-	-
	1,00E+03	-	39,44	41,49	-	-	1,45
	1,00E+02	-	37,87	-	-	-	-
	1,00E+01	39,97	40,66	-	-	-	0,49
A. Ecart type		-	1,40	-	-	-	1,36

<i>intI3</i> 10^2		<i>intI2</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI1</i>	1,00E+07	41,85	-	-	-	-	-
	1,00E+05	38,68	40,46	38,80	36,48	36,31	1,75
	1,00E+03	39,24	36,85	38,76	36,90	37,69	1,08
	1,00E+02	38,41	38,75	38,59	38,71	37,79	0,39
	1,00E+01	38,68	38,62	38,60	38,64	37,11	0,68
B. Ecart type		1,42	1,47	0,11	1,16	0,68	1,28

<i>intI3</i> 10^3		<i>intI2</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI1</i>	1,00E+07	36,39	36,41	35,17	33,40	35,22	1,23
	1,00E+05	33,75	33,90	32,55	33,57	33,23	0,54
	1,00E+03	34,30	34,05	33,23	34,27	34,34	0,47
	1,00E+02	34,80	34,91	34,51	35,07	34,27	0,32
	1,00E+01	35,30	35,23	34,96	35,14	34,67	0,25
C. Ecart type		1,01	1,01	1,14	0,81	0,73	0,94

<i>intI3</i> 10^5		<i>intI2</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI1</i>	1,00E+07	25,77	26,54	26,47	26,57	25,45	0,52
	1,00E+05	27,19	27,60	26,96	27,59	27,16	0,28
	1,00E+03	27,80	26,59	27,95	27,49	26,86	0,59
	1,00E+02	27,62	26,53	27,35	27,58	27,75	0,49
	1,00E+01	27,92	28,28	26,28	27,53	27,51	0,75
D. Ecart type		0,88	0,80	0,68	0,44	0,90	0,71

<i>intI3</i> 10 ⁷		<i>intI2</i>					Ecart type
		1,00E+07	1,00E+05	1,00E+03	1,00E+02	1,00E+01	
<i>intI1</i>	1,00E+07	20,00	20,42	20,10	19,56	19,98	0,31
	1,00E+05	20,13	20,21	19,63	20,18	19,91	0,24
	1,00E+03	20,23	20,36	20,45	20,31	20,11	0,13
	1,00E+02	20,40	20,43	19,99	19,98	19,80	0,28
	1,00E+01	20,28	20,28	20,10	19,99	19,95	0,16
E.	Ecart type	0,15	0,09	0,29	0,28	0,11	0,24

Tableaux 18 (A à E) : PCR triplex. Gammes croisées *intI1* + *intI2*, en présence de quantités fixes d'*intI3*. Résultats des C_t des points de gamme *intI3*.

Ces tableaux indiquent les C_t obtenus lors de l'amplification des points de gamme 10¹, 10², 10³, 10⁵ et 10⁷ (tableaux A à E) du gène *intI3* (fond vert) en présence des gammes croisées *intI1* (fond bleu) et *intI2* (fond saumon).

L'écart-type (fond jaune clair) permet de montrer la dispersion d'un même point de gamme selon la concentration de l'autre gène. La dispersion globale d'une même quantité d'*intI3* lors des 25 conditions testées est évaluée par l'écart-type surligné en jaune foncé.

▪ Sensibilité *intI3* :

Le tableau 17A montre clairement que l'amplification des points 10¹ copies d'*intI3* est un échec quasi-constant. Pour les points 10³, 10⁵ et 10⁷, l'amplification s'opère par contre systématiquement. Concernant l'essai mené avec 10² copies du gène *intI3*, le tableau 17B montre que l'amplification ne fonctionne pas lorsque la quantité d'*intI1* est à 10⁷ copies, et ce, quelle que soit celle d'*intI2*. Il convient de tirer de ces résultats la conclusion suivante : en présence des 2 gènes *intI1* et *intI2*, le seuil de détection du gène *intI3* est de 10² copies, excepté lorsque la quantité d'*intI1* est à 10⁷ copies, auquel cas, ce seuil est réévalué à 10³ copies.

▪ Dispersion des valeurs de C_t des points *intI3* :

Les écarts-types calculés montrent clairement que la dispersion des C_t des points *intI3* est d'autant plus faible que la quantité de gène présente est forte. Quand *intI3* est présent à 10³ copies, l'écart-type est déjà inférieur à 1 ; il passe ensuite à 0,71 et même 0,24 quand la quantité d'*intI3* devient égale à respectivement 10⁵ et 10⁷ copies.

Les résultats obtenus sont particulièrement probants : lorsque les 3 gènes *intI1*, *intI2* et *intI3* sont présents dans le même milieu réactionnel, le seuil de sensibilité de chacun est de 10² copies, et ce quelle que soient les concentrations respectives des deux autres gènes. La seule exception concerne le gène *intI3* pour lequel le seuil doit être rehaussé à 10³ copies quand *intI1* est présent à 10⁷ copies (peu importe la quantité du gène *intI2* présente).

De plus, et c'est à souligner, les efficacités calculées dans les différentes conditions d'amplification montrent que cette PCR multiplex est quantitative entre 10⁷ et 10³ copies.

b. Essais de spécificité

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 46.

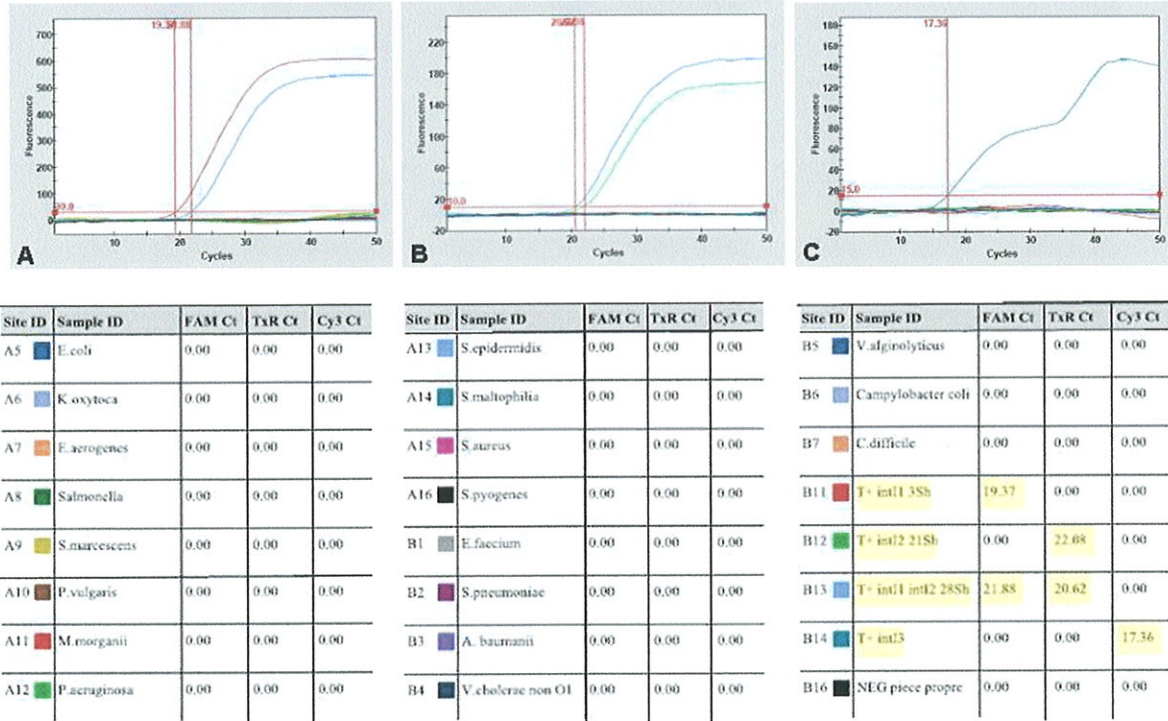


Figure 46 : PCR triplex. Essais de spécificité.

Quatre souches témoins et 19 souches tests *a priori* dénuées d'intégrons de résistance ont été soumises à la réaction de PCR en temps réel multiplex. La figure A représente la fluorescence émise dans le canal FAM (sonde *int11*), la figure B dans le canal TexasRed (sonde *int12*) et la figure C dans le canal Cy3 (sonde *int13*). Les tableaux situés sous les courbes représentent les différentes espèces bactériennes testées ainsi que les souches témoins. Les éléments surlignés en jaune montrent les souches pour lesquelles un signal a été détecté.

Le but de cet essai était de tester différents génomes bactériens afin de mettre en évidence dans des conditions de PCR triplex, l'éventuelle amplification d'un produit de PCR spécifique. Aucune des 19 espèces testées, aussi bien les bactéries à Gram négatif, que celles à Gram positif, n'a montré d'amplification spécifique. L'ADN génomique de la souche de *Vibrio cholerae* qui renferme pourtant une intégrase de superintégon (*VchInt1*) n'a pas non plus subi d'amplification parasite. Chaque témoin positif testé a été amplifié comme attendu : la souche 3Sh était bien positive en *int11*, la souche 21Sh en *int12*, la souche 28Sh à la fois en *int11* et *int12* et enfin la souche *Escherichia coli* 3603 en *int13*.

La PCR en temps réel multiplex mise au point constitue un très bon moyen de détection rapide des intégrons de résistance à partir de souches bactériennes.

B. Intégrons en microbiologie clinique

1. Souches bactériennes isolées d'hémocultures

a. Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des 49 souches de bacilles à Gram négatif isolées d'hémocultures chez des patients hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges durant l'année 2006 est résumée dans la figure 47.

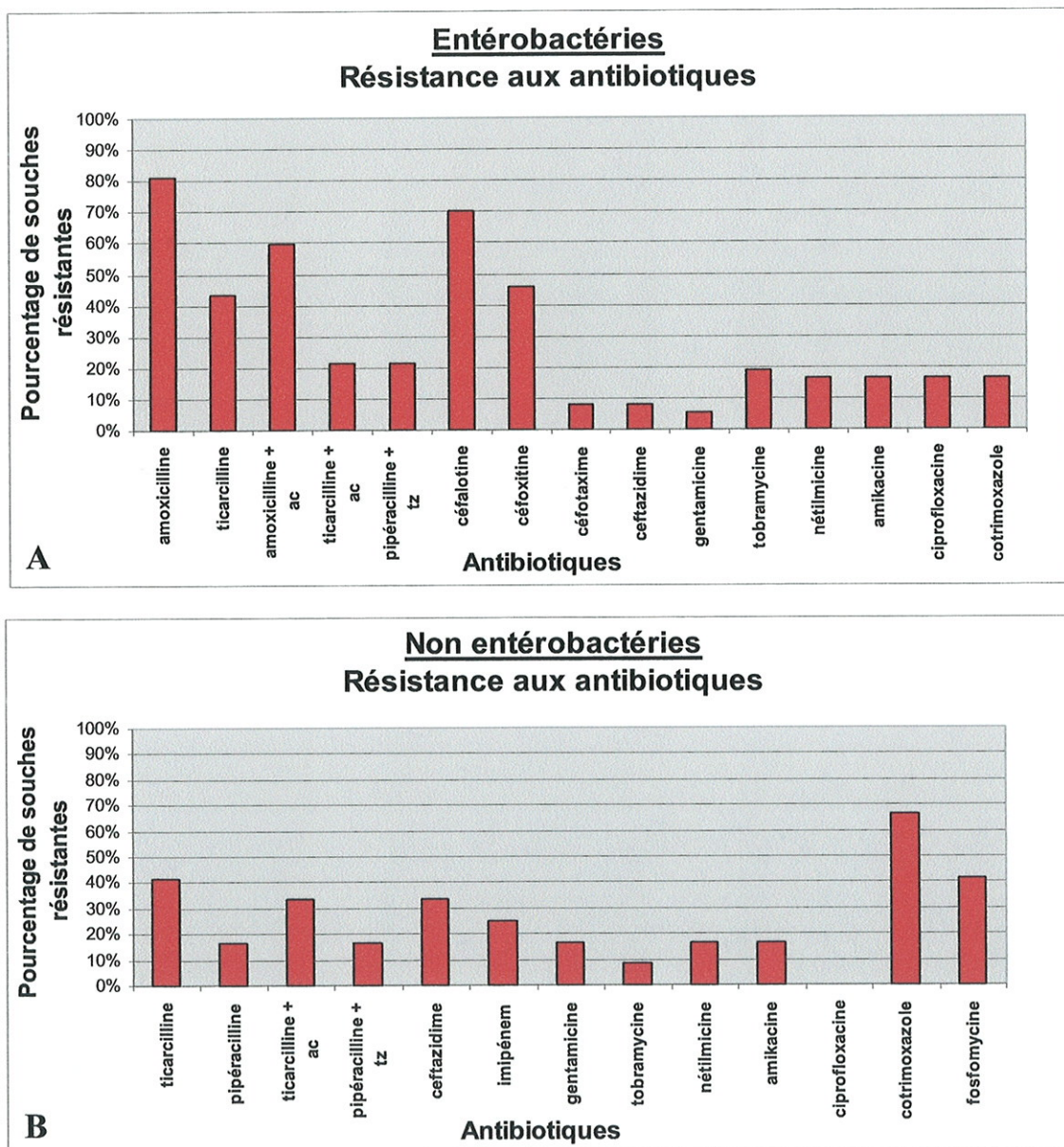


Figure 47 : Sensibilité des souches isolées d'hémocultures.

La figure 47A concerne les entérobactéries ; la figure 47B les bacilles à Gram négatifs non entérobactéries. ac : acide clavulanique ; tz : tazobactam.

Les entérobactéries isolées [Figure 47A] présentent des taux importants de résistance à l'amoxicilline (81 %), à la céfalotine (70 %) et à un degré moindre à la céfoxitine (46 %). Cette résistance s'explique en grande partie par la forte proportion de bactéries possédant une céphalosporinase naturelle (27/49). Les taux relativement élevés de résistance à la ticarcilline (43 %) ne peuvent par contre être expliqués par les seules 5 souches qui produisent une pénicillinase naturelle ; un mécanisme de résistance acquis intervient. Les résistances concernant les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) sont faibles (< 10%), tout comme celle vis-à-vis des aminosides, de la ciprofloxacine ou du cotrimoxazole (< 20%). Les résistances concernant les bacilles à Gram négatif non entérobactéries [Figure 47B] sont faibles. La résistance élevée au cotrimoxazole (67 %) s'explique par la forte proportion de souches de *Pseudomonas aeruginosa* (7/12) qui sont naturellement résistants à cette molécule.

b. Prévalence des intégrons

La technique de PCR en temps réel multiplex a été appliquée sur les 49 souches de bacilles à Gram négatif isolées. Un intégron de résistance a été détecté chez 8 souches bactériennes différentes, à raison de 6 souches *intI1* + et 2 souches *intI2* +. Aucun intégron de classe 3 n'a été retrouvé et aucune souche hébergeant à la fois un intégron de classe 1 et un intégron de classe 2 n'a été isolée [Tableau 19].

	<i>intI1</i> +	<i>intI2</i> +	<i>intI3</i> +	Total
Entérobactéries	6/37 (16,2 %)	2/37 (5,4 %)	0/37	8/37 (21,6 %)
Non entérobactéries	0/12	0/12	0/12	0/12
Total	6/49 (12,2 %)	2/49 (4,1 %)	0/49	8/49 (16,3 %)

Tableau 19 : Prévalence des intégrons au sein des entérobactéries et non entérobactéries isolées d'hémocultures chez des patients hospitalisés en Réanimation Polyvalente durant l'année 2006 au CHU de Limoges.

La prévalence globale des intégrons dans cette collection de 49 souches est de 16,3 % dont 12,2 % d'intégrons de classe 1 et 4,1 % d'intégrons de classe 2.

Les intégrons n'ont été retrouvés que chez les entérobactéries. La prévalence dans cette famille est de 16,2 % pour les intégrons de classe 1 et 5,4 % pour ceux de classe 2, soit une prévalence de globale en intégrons de 21,6 %.

c. Intégrons et résistances

Etant donné qu'aucun intégron n'a été retrouvé chez les non entérobactéries, l'étude de la relation entre intégrons et résistances a porté uniquement sur les 37 entérobactéries isolées. Les résultats sont résumés dans la figure 48.

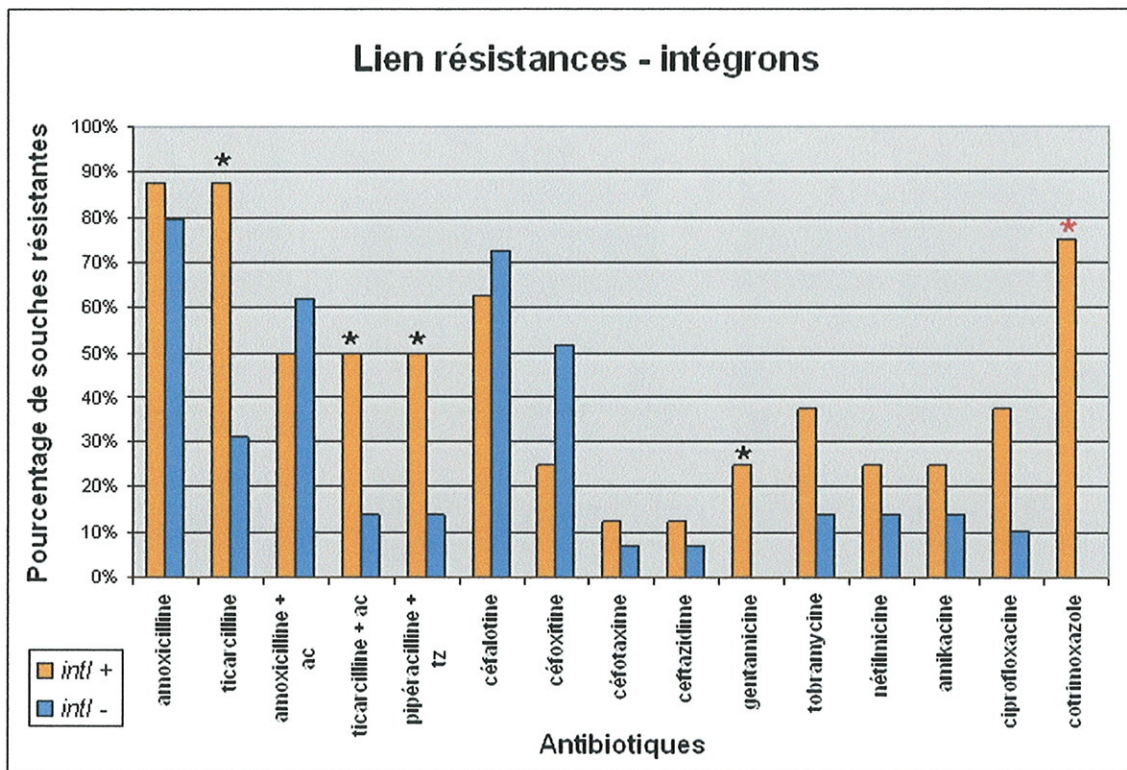


Figure 48 : Lien résistances – intégrons (entérobactéries). * : $p \leq 0,05$ - * : $p \leq 0,01$.
ac : acide clavulanique ; tz : tazobactam.

L'analyse statistique a révélé que seule l'association entre le cotrimoxazole (association triméthoprime + sulfaméthoxazole) et la présence d'un intégron était très statistiquement significative ($p = 0,0001$), aussi bien avec un intégron de classe 1 ($p = 0,0002$) que de classe 2 ($p = 0,0023$). Les associations entre intégrons et résistance à la ticarcilline, à la ticarcilline + acide clavulanique, à la piperacilline + tazobactam, et à la gentamicine sont aussi statistiquement significatives ($p \leq 0,05$), notamment pour la ticarcilline ($p = 0,012$).

d. Intégrons et résistance acquise

Les résultats précédents concernaient la totalité des entérobactéries, y compris celles qui présentaient un phénotype de résistance naturel. En étudiant seulement les résistances acquises, les résultats indiquent que plus de 50 % des entérobactéries qui présentent une résistance acquise à au moins 1 antibiotique hébergent un intégron [Tableau 20]. Cette association est fortement significative ($p = 0,0002$), mais uniquement pour les intégrons de classe 1 ($p = 0,0022$).

Entérobactéries	<i>intI1</i> +	<i>intI1</i> -	<i>intI2</i> +	<i>intI2</i> -	<i>intI</i> +	<i>intI</i> -
Résistance acquise à au moins 1 antibiotique	6/15 (40 %)	9/15 (60 %)	2/15 (13 %)	13/15 (87 %)	8/15 (53 %)	7/15 (47 %)
<i>p</i> value (test de Fischer)	0,0022		0,1577		0,0002	

Tableau 20 : Entérobactéries ayant une résistance acquise à au moins 1 antibiotique et présence d'intégrons.

Le lien entre résistance acquise à un antibiotique donné et présence d'un intégron est détaillé pour chaque antibiotique dans la figure 49.

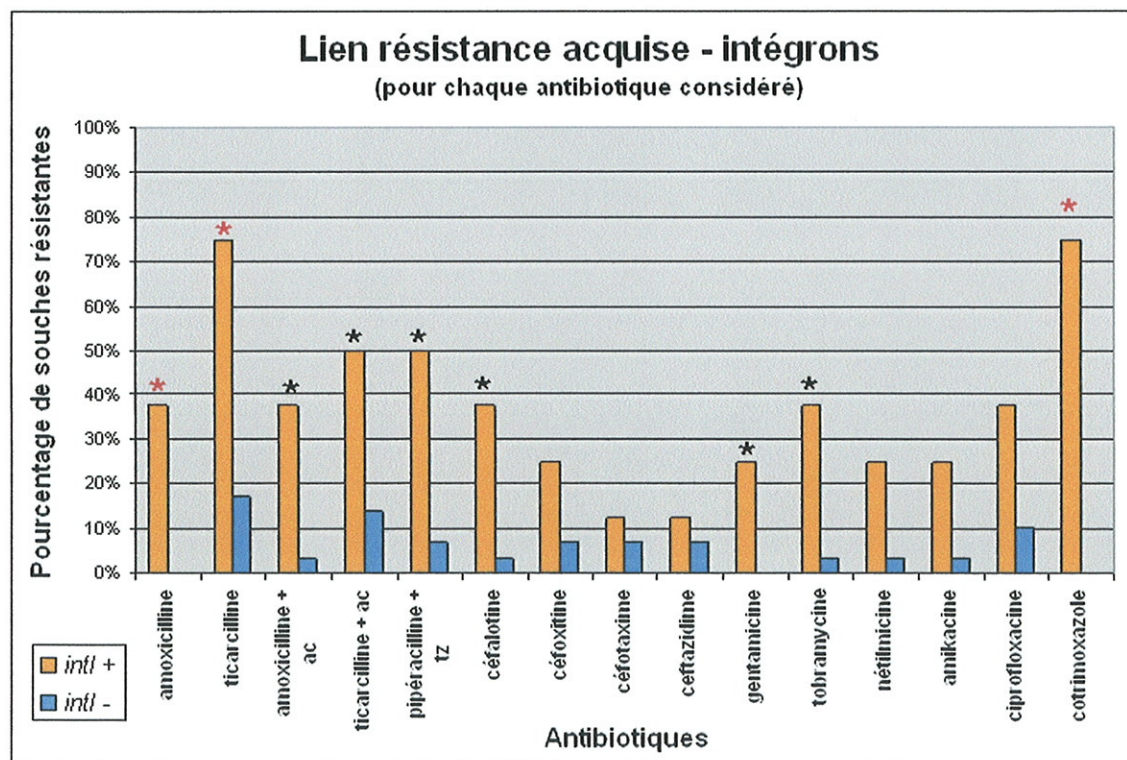


Figure 49 : Lien résistances acquises – intégrons (entérobactéries). * : $p \leq 0,05$ - ** : $p \leq 0,01$. ac : acide clavulanique ; tz : tazobactam.

L'association entre résistance acquise et présence d'un intégron est fortement significative pour trois antibiotiques : l'amoxicilline, la ticarcilline et le cotrimoxazole ($p \leq 0,01$). Une association statistique existe également avec amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline + acide clavulanique, pipéracilline + tazobactam, gentamicine et tobramycine ($p \leq 0,05$).

Il est intéressant de constater que la présence d'un intégron est quasiment toujours associée à un phénotype de résistance acquise aux β -lactamines : parmi les 15 souches d'entérobactéries présentant une résistance acquise aux β -lactamines, sept sont porteuses d'un intégron de classe 1 ou 2, soit un pourcentage de 53 %. Cette association est statistiquement significative ($p = 0,0011$), notamment pour les intégrons de classe 1 ($p = 0,0054$).

e. Sensibilité aux antibiotiques des souches *intl1* +

La sensibilité aux antibiotiques des 8 entérobactéries porteuses d'intégrons sont détaillés dans le tableau 21.

		<i>Escherichia coli</i> <i>intl1</i> +	<i>Escherichia coli</i> <i>intl1</i> +	<i>Escherichia coli</i> <i>intl1</i> +	<i>Citrobacter koseri</i> <i>intl1</i> +	<i>Salmonella Typhimurium</i> <i>intl1</i> +	<i>Escherichia coli</i> <i>intl1</i> +	<i>Proteus mirabilis</i> <i>intl2</i> +	<i>Proteus mirabilis</i> <i>intl2</i> +
		TRI	Case BN	Pase BN	BLSE	Pase HN	Pase BN	Pase HN	Pase BN
Béta-lactamines									
Amoxicilline	AMX	R	S	R	R	R	R	R	R
Ticarcilline	TIC	R	S	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + ac	AMC	R	S	S	R	R	S	R	S
Ticarcilline + ac	TCC	I	S	S	R	R	S	R	S
Céfalotine	CF	S	R	I	R	I	S	I	S
Céfoxitine	FOX	S	R	S	S	S	S	S	S
Céfotaxime	CTX	S	S	S	R	S	S	S	S
Ceftazidime	CAZ	S	S	S	R	S	S	S	S
Céfépime	FEP	S	S	S	I	S	S	S	S
Aztréonam	ATM	S	S	S	R	S	S	S	S
Impénème	IPM	S	S	S	S	S	S	S	S
Aminosides									
Gentamicine	GM	S	R	S	S	S	S	S	R
Tobramycine	TM	S	R	S	R	S	S	S	R
Nétilmicine	NET	S	S	S	R	S	S	S	R
Amikacine	A	S	S	S	R	S	S	S	I
Isépanicine	ISP	S	S	S	S	S	S	S	S
Cotrimoxazole									
Cotrimoxazole	SXT	R	S	R	R	S	R	R	R
Quinolones									
Acide nalidixique	NA	R	R	S	R	S	S	S	S
Ciprofloxacine	CIP	R	R	S	R	S	S	S	S

Tableau 21 : Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries porteuses d'intégrons isolées d'hémocultures de patients hospitalisés en Réanimation Polyvalente en 2006.

Pase : pénicillinase ; Case : céphalosporinase ; HN : haut niveau ; BN : bas niveau. TRI : pénicillinase résistante aux inhibiteurs ; BLSE : β -lactamase à spectre élargi ; ac : acide clavulanique.

Mis à part une souche d'*Escherichia coli* qui exprime une céphalosporinase naturelle à bas niveau, les 7 autres souches porteuses d'intégron possèdent toutes un mécanisme de résistance acquise aux β -lactamines, de type pénicillinase. Ce phénotype pénicillinase est exprimé à plus ou moins haut niveau selon les souches avec un phénotype BLSE (β -lactamase à spectre élargi) chez une souche de *Citrobacter koseri*. Trois souches expriment une résistance acquise aux aminosides, 6 au cotrimoxazole et 3 aux quinolones.

2. Souches bactériennes et liquides biologiques de patients en sepsis sévère

Entre le 13 juillet 2006 et le 2 Mai 2007, 24 patients ont été hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges avec comme motif d'entrée un sepsis sévère d'origine communautaire ou nosocomiale. Les flacons d'hémoculture et les liquides biologiques collectés ont fait l'objet d'une culture classique. Des bactéries à Gram positif et des levures ont été isolées chez 11 patients du protocole ; pour 4 patients, aucun germe n'a été retrouvé que ce soit à partir des hémocultures ou à partir des liquides biologiques. Chez les 9 autres patients, des bactéries à Gram négatif (espèces de la famille des entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été isolées.

Tous les sérums et les liquides biologiques ont fait l'objet d'une recherche d'intégrons par la technique de PCR en temps réel multiplex mise au point. Par contre, la recherche d'intégrons sur les souches bactériennes n'a porté que sur les bacilles à Gram négatif : après élimination des doublons (souches de même espèce et de même antibiogramme présentes chez un même patient dans deux sites différents), 11 bacilles à Gram négatif différents ont été analysés : 9 entérobactéries et 2 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'ensemble des données relatives à ces 24 patients (hémocultures, liquides biologiques, souches isolées) sont collectées dans le tableau 22. Le site infectieux suspecté, ainsi que l'origine communautaire ou nosocomiale de l'infection sont précisés.

N° PATIENT	TYPE DE PRELEVEMENT	RESULTATS DE LA CULTURE	ORIGINE DU SEPSIS	N° PATIENT	TYPE DE PRELEVEMENT	RESULTATS DE LA CULTURE	ORIGINE DU SEPSIS
1	Hémocultures	NEGATIF	Pulmonaire [C]	13	Hémocultures	NEGATIF	Pulmonaire [N]
	Sérum				Sérum		
	Aspiration bronchique	<i>Escherichia coli</i>			LBA	NEGATIF	
2	Hémocultures	NEGATIF	Pulmonaire [C]	14	Hémocultures	NEGATIF	Intra-abdominale / sans orientation [N]
	Sérum				Sérum		
	LBA Droit	NEGATIF			LBA gauche	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
3	Hémocultures	NEGATIF	Intra-abdominale [N]	15	Hémocultures	<i>Citrobacter koseri</i> (2flacons)	Intra-abdominale [N]
	Sérum				Sérum <i>int1+</i>		
	Incision opératoire <i>int1+</i>	<i>Enterobacter aerogenes int1+</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>			Aspiration bronchique	<i>Citrobacter koseri</i>	
					Liquide péritonéal <i>int1+</i>	<i>Citrobacter koseri int1+</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
4	Hémocultures	NEGATIF	Pleuro-pulmonaire [N]	16	Hémocultures	<i>Staphylococcus hominis</i> (2flacons)	Pulmonaire / sans orientation [N]
	Sérum				Sérum		
	Aspiration bronchique	NEGATIF			Aspiration bronchique	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
	Liquide pleural	NEGATIF					
5	Hémocultures	NEGATIF	Pulmonaire [C]	17	Hémocultures	NEGATIF	Urinaire [C]
	Sérum				Sérum		
	LBA	NEGATIF			Urine	<i>Escherichia coli</i>	
6	Hémocultures	NEGATIF	Pulmonaire [N]	18	Hémocultures	NEGATIF	Pulmonaire [N]
	Sérum				Sérum		
	Urine	NEGATIF			Aspiration bronchique	<i>Staphylococcus aureus</i> (x2)	
7	Hémocultures	NEGATIF	Urinaire [C]	19	Hémocultures	SCN	Pulmonaire [C]
	Sérum				Sérum		
	Urine	<i>Escherichia coli</i>			LBA	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus sp.</i>	
8	Hémocultures	NEGATIF	Intra-abdominale [N]	20	Hémocultures	NEGATIF	Intra-abdominale [N]
	Sérum				Sérum		
	Urine	Levures			Abcès hépatique	<i>Prevotella loesche</i>	
	Liquide péritonéal <i>int1+</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Enterobacter cloacae</i>			Liquide d'ascite	NEGATIF	
	Abcès intestinal	Levures			Ponction hépatique	NEGATIF	
	Abcès pari	<i>Enterobacter cloacae</i> Levures					
	Abcès intestinal	<i>Enterococcus faecalis</i> Levures					
9	Hémocultures	<i>Enterobacter cloacae int1+</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Intra-abdominale [N]	21	Hémocultures	<i>Escherichia coli</i> (1flacon)	Urinaire [C]
	Sérum	Levures + SCN			Sérum		
	Liquide péritonéal	SCN			Urine	NEGATIF	
10	Hémocultures	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1flacon)	Cutanée / sans orientation [N]	22	Hémocultures	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (1 flacon)	Méningée [C]
	Sérum				Sérum		
					LCR	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
11	Hémocultures	NEGATIF	Urinaire [C]	23	Hémocultures	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (x2)	Pulmonaire [?]
	Sérum				Sérum		
	Urine	NEGATIF			Aspiration bronchique	NEGATIF	
12	Hémocultures	NEGATIF	Urinaire / intra-abdominale [C]	24	Hémocultures	NEGATIF	Pulmonaire [?]
	Sérum				Sérum		
	Urine	<i>Escherichia coli</i>			Aspiration bronchique	<i>Staphylococcus aureus</i>	

Tableau 22 : Patients inclus dans le protocole sepsis entre le 13 juillet 2006 et le 2 mai 2007.

Les prélèvements pour lesquels ont été isolés un ou des bacilles à Gram négatif sont surlignés en saumon. La lettre entre crochets dans la colonne « origine du sepsis » indique si l'origine du sepsis est communautaire [C] ou nosocomiale [N].

a. Prévalence des intégrons

- Sur les souches

Seules 3 souches d'entérobactéries se sont révélées être porteuses d'intégrons de résistance de classe 1 : un *Enterobacter aerogenes* (patient numéro 3), un *Enterobacter*

cloacae (patient 8) et enfin un *Citrobacter koseri* (patient 15). Aucun intégron des classes 2 et 3 n'a été retrouvé. Concernant les 3 souches de *Pseudomonas aeruginosa*, aucun intégron de résistance n'a été retrouvé.

La prévalence en intégron chez les bacilles à Gram négatif isolés des patients en sepsis sévère de notre étude est donc de 27,3 %. En ne considérant que les entérobactéries, cette prévalence atteint 33,3 % [Tableau 23]. Ces résultats ne sont guère comparables à d'autres études car jusqu'à présent, aucune ne s'était intéressée à ce type de population de patients. Néanmoins, cette prévalence apparaît comme forte, mais elle n'est en rien significative étant donné l'échantillonnage restreint.

Il est à noter que les 3 souches d'entérobactéries porteuses d'intégrons de classe 1 concernent des infections d'origine nosocomiale.

	<i>intI1</i> +	<i>intI2</i> +	<i>intI3</i> +	Total
Entérobactéries	3/9 (33,3 %)	0/9	0/9	9
<i>P. aeruginosa</i>	0/2	0/2	0/2	2
Total	3/11 (27,3 %)	0/14	0/14	3/11 (27,3 %)

Tableau 23 : Prévalence des intégrons au sein des entérobactéries et non entérobactéries isolées de liquides biologiques et d'hémocultures de patients en sepsis sévère inclus dans l'étude.

- Sur les sérums

Un seul des 24 ADN extraits des sérums s'est révélé positif en intégron de classe 1. Il s'agit du sérum correspondant au patient 15. Aucun intégron des classes 2 et 3 n'a été retrouvé.

- Sur les liquides biologiques

Quatre des 34 ADN extraits de liquides biologiques se sont révélés être positifs en intégron de classe 1. Il s'agit de l'incision opératoire du patient 3, du liquide péritonéal et de l'abcès intestinal du patient 8, du liquide péritonéal du patient 15. Aucun intégron des classes 2 et 3 n'a été retrouvé.

Les résultats entre les données issues de la culture et celles issues de la biologie moléculaire sont concordants. Aucun sérum ou liquide biologique ne s'est révélé être positif en intégron alors qu'aucune souche correspondante n'avait été isolée.

Le patient 3 héberge au niveau d'une incision opératoire un *Enterobacter aerogenes* *intI1+*. L'ADN du liquide biologique est aussi positif pour *intI1*.

Le patient 8 héberge un *Enterobacter cloacae* *intI1+* retrouvé dans trois sites différents : un liquide péritonéal, un abcès de paroi, et un abcès intestinal. Une discordance existe à ce niveau car la PCR réalisée sur l'extrait d'ADN de l'abcès de paroi n'a pas permis de mettre en évidence l'intégron de classe 1, et ce malgré deux tentatives.

Le patient 15 héberge une souche de *Citrobacter koseri* *intI1+* isolée à partir de son sang, du liquide péritonéal et d'une aspiration bronchique. Comme avec le patient 8, une discordance existe car la PCR réalisée sur l'ADN extrait de l'aspiration bronchique n'a pas permis de mettre en évidence l'intégron de classe 1, et ce malgré deux tentatives.

b. Intégrons et résistance

Patient	Micro-organisme	AMX	TIC	PIP	AMC	TCC	TZP	CF	FOX	CTX	CAZ	FEP	AZM	IMP	GM	TB	NET	A	ISP	NA	NOR	OFX	PFX	CIP	SXT	FD	FOS	int1	int2	int3
1	<i>E.coli</i>	R	R		I	R	S	I	S	S	S			S	S	S	S	S		S	S	S		S	S	S				
3	<i>E. aerogenes</i>	R	R		R	R	I		R	I	R	I		S	S	R	R	I		R	R	R	I	S	I	I				
	<i>P.aeruginosa</i>		R	S		R	S				S	S	I	S	S	S	S	S	S					I	R	S				
7	<i>E.coli</i>	S	S		S	S	S	S	S	S	S			S	S	S	S	S		S	S	S		S	S	S				
8	<i>E.cloacae</i>	R	R		R	R	R	R	R	R	R	S		S	S	S	S	S		S	S	S		S	S	I				
12	<i>E.coli</i>	S	S		S	S	S	S	S	S	S			S	S	S	S	S		S	S	S		S	S	S				
15	<i>C. koseri</i>	R	R		I	I	I	R	R	R	R	I		S	S	R	R	I		R	R	R		R	R	I				
	<i>P.aeruginosa</i>		S	S		S	S				S	S	S	S	S	S	S	S	S					S	R	S				
16	<i>K. oxytoca</i>	R	R		S	S	S	S	S	S	S			S	S	S	S	S		S	S	S		S	S	S				
17	<i>E.coli</i>	S	S		S	S	S	S	S	S	S			S	S	S	S	S		S	S	S		S	S	S				
21	<i>E.coli</i>	S	S		S	S	S	R	S	S	S			S	S	S	S	S		S	S	S		S	S	S				

Tableau 24: Bacilles à Gram négatif isolés d'hémocultures et de liquides biologiques chez des patients inclus dans le protocole sepsis.

Les antibiotiques testés sont surlignés : les β -lactamines en vert, les aminosides en jaune, les quinolones en saumon, les autres antibiotiques (cotrimoxazole, nitrofurantoïne, fosfomycine) en bleu. Les souches positives en intégron de classe 1 sont notés en rouge.

AMX : amoxicilline ; TIC : ticarcilline ; PIP : pipéracilline ; AMC : amoxicilline et acide clavulanique ; TCC : ticarcilline et acide clavulanique ; TZP : pipéracilline et tazobactam ; CF : céfalotine ; FOX : céfoxitine ; CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; FEP : céfépime ; AZM : aztréonam ; IMP : imipénème ; GM : gentamicine ; TM : tobramicine ; NET : nétilmicine ; A : amikacine ; ISP : isépanicine ; NA : acide nalidixique ; NOR : norfloxacine ; OFX : ofloxacine ; PFX : péfloxacin ; CIP : ciprofloxacine ; SXT : cotrimoxazole ; FD : nitrofurantoïne ; FOS : fosfomycine.

A la lecture du tableau 24, il est à noter que les trois souches porteuses d'intégrons sont les trois souches multirésistantes : résistance aux β -lactamines, résistance aux aminosides, résistance au cotrimoxazole. Les autres souches sont plus sensibles aux antibiotiques. Etant donné l'échantillonnage limité, un seul test statistique pertinent a été effectué. Il concerne la relation entre une résistance acquise à au moins un antibiotique et la présence d'un intégron de classe 1 : trois-quarts des bactéries de l'étude sont concernées [Tableau 25]. Cette association est statistiquement significative ($p \leq 0,05$).

	<i>intI1</i> +	<i>intI1</i> -
Entérobactéries résistantes à au moins 1 antibiotique (résistance acquise)	3/4 (75,0%)	1/4 (25,0%)
<i>p</i> value (test de Fischer)	0,0476	

Tableau 25 : Entérobactéries ayant une résistance acquise à au moins 1 antibiotique et présence d'intégrons.

c. Antibiogramme des souches *intI1* +

La sensibilité aux antibiotiques des 3 entérobactéries porteuses d'intégrons sont détaillés dans le tableau 26.

		<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter koseri</i>
		<i>intI1</i> +	<i>intI1</i> +	<i>intI1</i> +
		Case déréprimée	Case déréprimée	BLSE
Béta-lactamines				
Amoxicilline	AMX	R	R	R
Ticarcilline	TIC	R	R	R
Amoxicilline + ac	AMC	R	R	I
Ticarcilline + ac	TCC	R	R	I
Céfalotine	CF	R	R	R
Céfoxitine	FOX	R	R	R
Céftaxime	CTX	I	R	R
Ceftazidime	CAZ	R	R	R
Céfépime	FEP	S	S	I
Aztréonam	ATM	I	R	R
Impénème	IPM	S	S	S
Aminosides				
Gentamicine	G	S	S	S
Tobramycine	T	R	S	R
Nétilmicine	N	R	S	R
Amikacine	A	R	S	R
Isépamicine	ISP	S	S	S
Cotrimoxazole				
Cotrimoxazole	SXT	I	S	R
Quinolones				
Acide nalidixique	NA	R	S	R
Ciprofloxacine	CIP	S	S	R

Tableau 26 : Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries porteuses d'intégrons isolées de patients hospitalisés en sepsis sévère.

Case : céphalosporinase ; BLSE : β -lactamase à spectre élargi ; ac : acide clavulanique.

Chacune des 3 souches d'entérobactérie porteuse d'intégron de classe 1 présente un phénotype de résistance important vis-à-vis des β -lactamines, puisque deux souches possèdent une céphalosporinase dérégulée, et la troisième une β -lactamase à spectre élargi (BLSE). La souche d'*Enterobacter cloacae* ne présente pas d'autres résistances acquises vis-à-vis des antibiotiques testés. Par contre, la souche de *Citrobacter koseri*, seule souche retrouvée dans une hémoculture, est résistante à quasiment tous les antibiotiques testés.

Le but principal de cette étude était la détection, directement à partir de prélèvements biologiques extraits, des intégrons de résistance. La PCR en temps réel a permis de détecter correctement les intégrons lorsque ceux-ci étaient présents, et ce, malgré un environnement génétique plus complexe qu'une souche bactérienne, mêlant de l'ADN bactérien, humain, fongique voire viral. La spécificité de la réaction de PCR n'a pas été prise en défaut, preuve en est l'absence de signal lorsqu'aucun intégron n'était présent.

Discussion

V. Discussion

L'objectif principal de nos travaux était de mettre au point une technique capable de détecter rapidement et de façon spécifique des intégrons de résistance au sein de souches bactériennes, mais aussi au sein d'environnements génétiques plus complexes. Afin de répondre à ces exigences, le recours à une PCR en temps réel multiplex avec chimie Taqman[®] nous a paru évident. Il a été motivé par trois principaux éléments : la nécessité de spécificité, la nécessité d'une bonne sensibilité et enfin un critère de rapidité et de facilité d'interprétation des résultats.

La première difficulté rencontrée, et non des moindres, a été de réaliser la conception des amorces et des sondes selon un cahier des charges complexe. Néanmoins, en tenant compte au mieux des exigences liées aux gènes, aux amorces et aux sondes, il a été possible de développer des PCR simplex sensibles, reproductibles et spécifiques de chacune des intégrases.

La nécessité de spécificité de la réaction de PCR a été l'un des arguments majeurs de recours à la PCR en temps réel avec sonde fluorogénique. L'appartenance et donc la similitude des intégrases d'intégrons à la grande famille des tyrosines à recombinases [3] et la forte identité des intégrases entre elles [Tableau 1], font qu'il est très difficile d'obtenir des réactions d'amplification spécifiques. Preuve en sont les réactions d'amplification croisées obtenues avec bon nombre d'amorces décrites jusqu'alors [162], mais aussi les travaux menés antérieurement au laboratoire. Des essais préalables nombreux réalisés en PCR en point final ou en PCR temps réel avec chimie SYBR[®] Green, se heurtaient à des difficultés d'interprétation des résultats : bandes parasites sur gel d'agarose, points de fusion douteux, et ce même dans les conditions les plus simples et les plus favorables, à savoir une PCR simplex sur de l'ADN génomique de souches bactériennes.

Les essais menés lors de la mise au point des trois PCR simplex n'ont pas révélé de réactions croisées aspécifiques, aussi bien avec de fortes concentrations en plasmides témoins qu'avec les ADN génomiques de souches témoins renfermant les deux autres intégrases. En condition de PCR multiplex, les essais effectués avec différentes espèces bactériennes dénuées d'intégrases, sont restés négatifs. Ces résultats sont pleinement rassurants quant à la spécificité de la réaction de PCR mise au point, même si idéalement, il aurait été intéressant de tester un plus grand nombre et une plus grande variété d'espèces bactériennes.

Le critère d'une bonne sensibilité ne revêt pas d'intérêt particulier pour la recherche d'intégrons à partir de l'ADN de souches bactériennes ; en effet, les quantités d'ADN génomique extraites à partir d'un bouillon de culture sont très importantes et de plus, les intégrons sont généralement localisés sur des plasmides présents en multi-copies chez la bactérie. En revanche, il est nécessaire de disposer d'une bonne sensibilité de détection dès lors que l'on s'intéresse à un environnement génétique complexe et varié où la concentration en intégron est faible. Alors que la plupart des travaux s'étaient intéressés jusqu'alors à des souches bactériennes, les études épidémiologiques les plus récentes montrent qu'il est désormais nécessaire de rechercher les intégrons de résistance à partir d'échantillons d'eaux, de sols, de selles... afin de mieux évaluer leur réel impact environnemental. Pour rappel, les travaux de Barlow et collaborateurs en 2004 [114] avaient ainsi montré une prévalence en intégrons beaucoup plus importante lorsque leur recherche était effectuée directement à partir d'un extrait de l'ADN de selles animales qu'à partir de souches issues d'une mise en culture des échantillons.

Devant ces considérations, il était souhaitable de disposer d'une technique ayant une bonne sensibilité, et ce, malgré le multiplexage. La technique de PCR multiplex mise au point permet de détecter jusqu'à 10^2 copies d'un gène d'intégrase, et ce, quelque soit la concentration des autres gènes d'intégrase présent. La seule exception concerne le cas où le gène *intI1* est présent à raison de 10^7 copies : dans ce cas, la sensibilité de détection du gène *intI3* est de « seulement » 10^3 copies, et ce, quelle que soit la concentration du gène *intI2*. Néanmoins, en cas de doute, il est toujours possible de réaliser une PCR simplex où, quel que soit le gène ciblé, la sensibilité de la réaction est de 10^1 copies. Il faut néanmoins replacer ces notions de seuil dans le contexte épidémiologique : le caractère exceptionnel des intégrons de classe 3 fait que l'intérêt de la PCR en temps réel multiplex développé est essentiellement axé sur la détection simultanée des intégrons de classe 1 et 2. Dans ce cas, la sensibilité de la réaction est de 10^2 copies, aussi bien pour *intI1* que pour *intI2*, et ce, quelle que soit la quantité de l'autre gène.

La PCR en temps réel apporte, du fait notamment de la suppression des étapes de post-PCR, une rapidité de rendu des résultats évidente. Ainsi, il est possible en quelques heures de savoir si une souche héberge ou non un intégron de résistance. Des essais menés en parallèle de cette étude ont même montré que l'étape d'extraction de l'ADN génomique par ébullition pouvait être supprimée. Une simple suspension bactérienne suffit, vraisemblablement grâce à l'étape d'activation de la polymérase pendant 10 minutes à 95°C qui permet de libérer l'ADN dans le milieu réactionnel. Ainsi, il est possible de savoir si une bactérie héberge un intégron

en moins de deux heures. Nous avons travaillé avec l'appareil de PCR en temps réel SmartCycler® II, qui implique un volume réactionnel minimal de 25 µL. Dans un but d'application de cette technique à des études épidémiologiques, il serait intéressant de pouvoir réaliser cette PCR multiplex avec un appareil de PCR en temps réel à grand débit (en plaque 96 puits) permettant de tester de nombreux échantillons en une fois et d'utiliser un volume réactionnel moindre. Nous avons montré, à la suite de cette étude, que pour la détection d'intégrons à partir de souches bactériennes, la réaction de PCR restait efficace dans un volume réactionnel final de seulement 10 µL. Ceci a l'avantage non négligeable d'économiser l'ensemble des réactifs (sondes, polymérase), tout en testant dans une même expérimentation jusqu'à 70 échantillons.

L'un des avantages de travailler en sonde fluorogénique concerne le rendu de résultat. Contrairement à la chimie SYBR® Green où l'interprétation du point de fusion peut être soumise à discussion, l'interprétation du résultat d'une PCR réalisée en chimie Taqman® est beaucoup plus simple. Dans ce cas où la quantité d'ADN est importante, et c'est le cas lorsque l'on travaille avec de l'ADN extrait d'une souche, un signal est détecté précocement (généralement C_t entre 15 et 25). Sauf réaction d'amplification aspécifique ou contamination, tout signal détecté dans le canal de fluorescence relatif à chaque sonde, signifie la présence d'un intégron de résistance. L'interprétation est donc aisée.

Comme toute technique développée, la PCR en temps réel que nous avons mis au point n'est pas parfaite et présente quelques écueils et défauts. Son principal écueil réside dans l'absence d'un témoin interne d'amplification. Lorsque l'échantillon est une souche bactérienne pure, la présence d'inhibiteurs est négligeable et ne perturbe pas la réaction d'amplification. Un témoin interne n'est donc pas indispensable dans ce cas. Par contre, un échantillon issu de l'extraction de selles, de liquides biologiques (sang) ou encore du sol peut contenir des inhibiteurs de PCR. Malgré la qualité des kits d'extraction proposés, ceux-ci ne sont pas toujours capables d'éliminer ces inhibiteurs ; un gène pourtant présent subit alors un échec d'amplification. Il serait donc intéressant de disposer d'un témoin interne. Deux solutions sont envisageables : la première est de développer une autre PCR avec une autre sonde fluorogénique afin de détecter un autre gène (par exemple gène codant l'ARN ribosomal 16S pour de l'ADN bactérien ou gène codant la β 2-microglobuline à partir de liquides biologiques), mais le problème réside à ce stade dans l'introduction d'un nouveau couple d'amorces et d'une sonde supplémentaires qui risquent de perturber les efficacités des trois autres réactions. La deuxième solution serait de rajouter dans un deuxième aliquot d'un

même échantillon une quantité fixe d'un gène cible (par exemple *intI3*), et de réaliser ainsi une contamination volontaire. Ainsi, l'absence de signal dans les deux puits réactionnels signifie la présence d'inhibiteurs. Ceci est tout à fait possible, mais outre les risques de contamination d'autres échantillons, cette méthode implique d'utiliser deux puits réactionnels pour un même échantillon, d'où un coût supplémentaire.

Autre inconvénient qui est pourtant initialement un avantage : la sensibilité. Avoir une sensibilité aussi basse est un élément très intéressant, mais l'inconvénient indirect est de détecter des contaminations éventuelles qui en temps normal oscillent entre 10 et 100 copies. Lors de la mise au point, il a parfois été observé un signal d'amplification en fin de réaction, y compris avec des souches. Lorsque celles-ci étaient réextraites dans des conditions plus précautionneuses (nettoyage des pipettes, cônes neufs), aucun signal n'était détecté, preuve de l'absence de réactions croisées, mais au contraire d'une contamination lors de l'extraction. La technique de PCR en temps réel impose donc une organisation optimale lors de chaque étape de l'analyse, tant lors de la préparation du mix réactionnel qui doit se faire en l'absence de tout ADN, que lors de l'extraction et de l'ajout des échantillons. Or, le fait de travailler sur des souches bactériennes est une problématique supplémentaire car les quantités de gènes cibles manipulées sont très importantes, de l'ordre de 10^7 à 10^9 copies par UFC (Unité Formant Colonie).

Un des problèmes rencontrés lors de la mise au point a été l'émission parasite de fluorescence de la sonde FAM dans le canal Cy3. La conséquence a été de devoir réévaluer le seuil de détection du gène *intI3* à 15 unités de fluorescence, au lieu de 10 en condition simplex. Etant donné la faible intensité du signal émis par la sonde marquée par ce fluorophore, le fait d'augmenter le seuil de seulement 5 unités de fluorescence, a eu pour conséquence de diminuer la sensibilité de détection du gène *intI3*. La résolution de ce problème technique passe soit par le changement du fluorophore (un *reporter* de type Cy5 dont le spectre est situé dans des longueurs d'onde supérieures pourrait par exemple convenir), soit par la recalibration du *reporter* Cy3, soit encore par le passage des échantillons sur un autre appareil ayant un meilleur pouvoir résolutif pour ce canal.

La technique de PCR développée s'est révélée performante sur les souches isolées d'hémoculture : elle a permis en peu de temps de détecter les intégrons de résistance et a établi pour la population étudiée une prévalence en intégrons de 16,3 %. Aucun intégron n'a été retrouvé chez les non entérobactéries ; ce résultat n'est guère surprenant étant donné le faible nombre de ces souches isolées (seulement 12), et concorde de plus avec leur phénotype

de résistance : les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, outre leur phénotype de résistance naturel dont le support est chromosomique, exprimaient peu de résistances acquises : les quelques résistances relevées impliquaient vraisemblablement des mécanismes d'efflux. La description d'intégrons au sein de l'espèce *Acinetobacter baumannii* est une donnée fréquente dans la littérature [43, 49, 68, 69], mais dans notre étude la seule souche isolée s'est révélée non porteuse d'intégron ; elle présentait un phénotype assez sensible aux antibiotiques, les seules résistances observées étant des résistances naturelles.

Concernant les entérobactéries de l'étude, la prévalence était de 21,6 %. Malgré un effectif relativement faible (37 souches), ces chiffres semblent être supérieurs à ceux de la littérature. Heir et collaborateurs ont retrouvé en 2004 [125] une prévalence des intégrons de classe 1 de 10,9 % au sein de 192 entérobactéries isolées d'hémocultures chez des patients de différents hôpitaux norvégiens. Schmitz et collaborateurs ont, quant à eux, trouvé une prévalence de 17,4 % sur 300 entérobactéries isolées d'hémocultures en 1999 à l'hôpital de Düsseldorf [126]. Néanmoins, ces chiffres concernaient des bactéries isolées d'hémocultures de patients hospitalisés dans tout type de services cliniques, contrairement à notre étude où les patients sont hospitalisés dans un service de réanimation. Ceci explique vraisemblablement la prévalence plus élevée : dans ces unités de soins intensifs, les bactéries multirésistantes sont plus nombreuses et la pression de sélection par les antibiotiques y est plus grande [166]. Martinez-Frejjo en 1998 avait montré une prévalence en intégrons de 43 % au sein de 163 entérobactéries isolées d'unités de soins intensifs de 14 hôpitaux européens [129]. De même, une étude grecque très récente qui a porté sur l'analyse de 250 souches d'entérobactéries isolées d'hémocultures, a décrit une prévalence en intégrons supérieure à celle de notre étude avec un pourcentage de 32,4 % [167]. Une analyse intéressante à envisager serait de déterminer cette prévalence sur plusieurs années afin de voir son évolution, et notamment, comme l'ont montré Schmitz et collaborateurs [126], si ces chiffres sont en augmentation au fil du temps.

Le fort lien statistique que nous avons montré entre la présence d'intégron et la résistance au cotrimoxazole qui est l'association du triméthoprimé et du sulfaméthoxazole a déjà été montré dans plusieurs études [131, 167]. Les cassettes *dfr* codant la résistance au triméthoprimé, sont très fréquemment décrites chez les intégrons [168]. Or, la résistance au triméthoprimé entraîne une perte de synergie de l'association triméthoprimé-sulfaméthoxazole dans plus de 75 % des cas, il n'est donc pas étonnant alors de trouver un lien entre intégron et résistance au cotrimoxazole. De plus, le gène *sulI* qui confère une résistance au sulfaméthoxazole est présent dans au moins 90 % des intégrons de classe 1 au

niveau de la région 3'. Les bactéries hébergeant un intégron avec une cassette *dfr* et le gène *sulI* exprimeront une résistance de haut niveau au cotrimoxazole. La résistance au cotrimoxazole constitue donc un très bon marqueur de présence d'intégron. Notre étude a également montré une association significative entre présence d'intégron et résistance à la gentamicine ; ce lien est fréquemment décrit pour les aminosides en général, et la gentamicine en particulier. En effet, plusieurs cassettes d'intégrons décrites confèrent une résistance à cet antibiotique : *aadB*, les cassettes codant une AAC(6')-II, celles codant une AAC(3)-I ou encore une AAC(3)-VI. Même si de nombreux travaux décrivent des cassettes de résistance aux β -lactamines, notamment des cassettes codant des enzymes à large spectre, c'est-à-dire codant une résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G), la relation statistique très significative ($p \leq 0,01$) établie entre intégron et amoxicilline et ticarcilline que nous avons montrée dans cette étude n'a été que peu retrouvée lors d'études antérieures. Après analyse de près de 900 souches, Leverstein-van Hall a établi que la résistance à l'ampicilline, à la pipéracilline et au céfuroxime était prédictive de la présence d'un intégron [130] ; une étude récente effectuée dans deux unités de soins intensifs a également établi une relation entre intégrons et résistance à la pipéracilline [169], mais ce lien est quelque peu biaisé car l'étude ne se basait que sur des souches de sensibilité diminuée aux céphalosporines (souches capables de croître en présence de 8 mg.L⁻¹ de cefpodoxime). Dans notre étude, la population d'entérobactéries ne comportait qu'une seule souche avec une pénicillinase à large spectre (BLSE), les autres étant des pénicillinases à bas ou haut niveau, mais pour lesquelles la sensibilité aux C3G était conservée. Etant donné la faible fréquence des gènes de pénicillinase chez les intégrons, il est possible que cette résistance associée à la présence d'intégrons soit en fait le reflet d'un plasmide hébergeant à la fois un gène de pénicillinase localisé en dehors du support intégron et un intégron avec d'autres cassettes.

L'application de la technique de PCR multiplex sur les souches issues des patients en sepsis sévère a révélé, comme dans l'application précédente, la présence d'intégrons uniquement au sein des espèces d'entérobactéries. Les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées exprimaient pour l'une un phénotype de résistance naturel, et pour l'autre une résistance aux antibiotiques ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, et aztréonam évoquant un mécanisme d'efflux de type MexAB-OprM, dont le support chromosomique est indépendant de la présence d'un intégron. Les trois souches porteuses d'intégrons de classe 1 étaient des entérobactéries multi-résistantes : elles présentaient toutes les trois un phénotype de résistance aux β -lactamines à large spectre, soit de type céphalosporinase déréprimée, soit

de type BLSE. Deux souches exprimaient des résistances aux aminosides (résistance à la triade tobramycine, nétilmicine, amikacine) probablement liées à la présence d'une cassette codant une AAC(6')-I. Le lien intégron et résistance au cotrimoxazole est aussi présent car 2 souches sur 3 exprimaient une résistance à cet antibiotique. La souche d'*Enterobacter cloacae* n'a pas montré de résistance à d'autres antibiotiques que les β -lactamines. Néanmoins, même si le phénotype de résistance de cette souche, à savoir une céphalosporinase déréprimée, n'est pas lié à un intégron car d'origine chromosomique, il est fort probable que cette souche présente des résistances à d'autres antibiotiques non testés qui sont liées à des cassettes d'intégron. Nous avons donc effectué sur cette souche un antibiogramme complémentaire qui a montré une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine qui est la marque de la présence d'une cassette *aadA* très répandue chez les intégrons de classe 1 et 2 [123].

Ces 3 souches d'entérobactéries porteuses d'intégrons concernaient des infections d'origine nosocomiale. Même si cette relation est significative ($p = 0,0456$), l'échantillonnage est trop faible pour affirmer qu'il existe un réel lien. Ce lien intégron - infection nosocomiale peut être simplement le reflet indirect du lien intégron – multirésistance ; en effet, la multirésistance aux antibiotiques était considérée jusqu'à récemment comme une quasi-exclusivité des bactéries circulant en milieu hospitalier. Cependant, des études ont montré que le portage d'intégrons ne se limitait pas aux souches hospitalières. Les travaux de Leverstein-van Hall [131] ont montré un portage digestif en intégrons non négligeable dans la population générale (19 %). Une étude récente menée dans une unité de soins intensifs et recherchant les intégrons chez tout patient admis dans cette unité a montré, là encore, que des patients sans antécédent récent d'hospitalisation étaient porteurs d'intégrons à l'admission [169]. Il ne faut donc pas « négliger » les bactéries à l'origine d'infections communautaires comme réservoirs d'intégrons. Afin de disposer de données complémentaires à notre étude, une étude plus élargie sur l'ensemble des souches isolées dans le service de Réanimation est en cours. L'objectif est d'étudier la réelle prévalence des intégrons au sein du service, en s'intéressant non seulement aux souches impliquées dans la pathogénie, mais également à celles commensales de portage digestif, et ce, dès le premier jour d'admission du patient.

Les résultats concernant les liquides biologiques ont montré que notre technique de PCR pouvait s'appliquer à des environnements génétiques plus complexes qu'un simple ADN bactérien, tout en restant spécifique. D'autre part, grâce à sa bonne sensibilité, il a été ainsi possible de détecter, dès le jour de l'admission du patient en réanimation, soit 48, voire 72 heures avant le rendu du résultat de la culture bactérienne, la présence d'un intégron. La détection d'un intégron signe tout d'abord la présence d'ADN bactérien, ce qui peut

constituer en soit une information importante pour le clinicien si le liquide biologique analysé est normalement stérile, d'autant plus qu'il existe alors une probabilité forte qu'il s'agisse d'une bactérie à Gram négatif, les intégrons étant décrits majoritairement chez les bactéries à Gram négatif. La deuxième information apportée est que, étant donné le lien décrit entre intégrons et multirésistance, la ou les bactéries impliquées dans le processus infectieux ont une ou plusieurs résistances acquises aux antibiotiques, voire une multirésistance. En raisonnant de manière prospective, cet outil pourrait constituer un élément intéressant pour le clinicien dans le choix de son antibiothérapie probabiliste. En effet, il a été montré que dans le cas du sepsis, plus une antibiothérapie adaptée était instaurée précocement, plus le patient avait de chance de survivre à son infection et plus le nombre de jours d'hospitalisation était réduit [170]. Il serait intéressant d'étudier dans une étude clinique prospective l'effet de la détection d'intégrons sur la prise en charge thérapeutique du patient et son évolution clinique.

La détection d'un intégron peut aussi avoir des conséquences en terme de prévention de la diffusion des bactéries résistantes au sein d'un service. En effet, les intégrons sont généralement hébergés par des plasmides qui ont une grande capacité à être transmis d'une bactérie à une autre [171], entraînant ainsi rapidement au sein d'un service une diffusion de résistances qui peuvent être multiples si le plasmide héberge plusieurs gènes de résistance et si l'intégron accueille plusieurs cassettes. Des mesures d'hygiène peuvent donc être mises immédiatement en œuvre dès la détection d'un intégron sans attendre l'isolement de la souche et son antibiogramme. Pouvoir disposer d'une méthode de détection rapide des intégrons a aussi un intérêt sur un plan épidémiologique, non seulement en terme d'étude de prévalence, mais également comme suivi d'infections nosocomiales. En effet, comme certains auteurs l'ont montré, la détection des intégrons de résistance peut être considérée comme un outil utile permettant la surveillance et facilitant la détection rapide de cas d'infections croisées, spécialement dans des unités à risque comme les unités de soins intensifs [134, 169].

Cette étude s'inscrit dans une démarche plus globale de détection génotypique des marqueurs de résistance. Rechercher l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques décrits n'est pas encore envisageable au jour d'aujourd'hui en raison de leur nombre bien trop important (rien que pour les β -lactamines, plus d'une centaine d'enzymes β -lactamases différentes ont été décrites), c'est pourquoi s'intéresser non pas à un gène, mais à un support génétique de résistance tel que les intégrons peut constituer une alternative intéressante car plus accessible.

Conclusion

Les techniques de détection des intégrons par PCR décrites jusqu'à présent se heurtaient souvent à des problèmes de spécificité, notamment en raison de la forte homologie entre les différents gènes d'intégrases. Nos travaux ont permis de développer une technique de PCR en temps réel multiplex performante, capable de détecter rapidement et de façon spécifique des intégrons de résistance. Elle s'est révélée spécifique du gène cible amplifié et n'a pas été prise en défaut à la fois en présence d'une autre intégrase, mais également en présence d'extraits d'ADN de bactéries dénuées d'intégrons et d'extraits d'ADN non bactériens.

Nous avons montré que cette technique était applicable non seulement à partir d'ADN extrait de souches bactériennes, mais aussi à partir d'environnements génétiques plus complexes comme les liquides biologiques. Ceci est très intéressant car il est probable que la recherche d'intégrons limitée à la seule détection à partir de souches bactériennes sous-estime la quantité d'intégrons présente. Cela a été montré dans de rares études : Barlow et collaborateurs en 2004 [114] ont montré une prévalence en intégrons beaucoup plus importante directement à partir d'un extrait de l'ADN de selles animales qu'à partir de souches issues d'une mise en culture des échantillons. Ceci suggère que des intégrons existent chez des souches difficilement cultivables. Nandi et ses collaborateurs ont aussi montré la forte prévalence d'intégrons en recherchant directement les intégrons sur des échantillons de litière dans des élevages de poulet, sans passer par l'étape de culture [88].

L'application de cette technique de PCR multiplex est donc large, à la fois dans des études épidémiologiques sur des souches bactériennes mais aussi sur des extraits d'ADN à partir de l'environnement ou dans des études de portage digestif chez des patients dans la population générale, peu de données étant actuellement disponibles dans ce domaine.

Bibliographie

Bibliographie

1. Stokes HW, Hall RM.

A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 1989, 3(12), 1669-1683.

2. Hall RM, Collis CM.

Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 1995, 15(4), 593-600.

3. Nunes-Duby SE, Kwon HJ, Tirumalai RS, Ellenberger T, Landy A.

Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(2), 391-406.

4. Hansson K, Sundstrom L, Pelletier A, Roy PH.

IntI2 integrase in *Tn7*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(6), 1712-1721.

5. Hall RM, Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW.

Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, 870, 68-80.

6. Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM.

Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(2), 477-490.

7. Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RM.

Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology*, 2000, 146(11), 2855-2864.

8. Collis CM, Hall RM.

Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features. *Microbiology*, 2004, 150(5), 1591-1601.

9. Levesque C, Brassard S, Lapointe J, Roy PH.

Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene*, 1994, 142(1), 49-54.

10. Recchia GD, Hall RM.

Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, 1995, 141, 3015-3027.

11. Collis CM, Hall RM.

Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Molecular Microbiology*, 1992, 6(19), 2875-2885.

12. Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P.

Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(1), 235-249.

13. Bissonnette L, Roy PH.

Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(4), 1248-1257.

- 14. Ploy MC, Gassama A, Chainier C, Denis F.**
Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques.
Immuno-analyse et Biologie Spécialisée, 2005, 20(6), 343-352.
- 15. Hall RM, Collis CM.**
Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons.
Drug Resistance Updates, 1998, 1(2), 109-119.
- 16. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M.**
PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*blaIMP*) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams.
Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(12), 2909-2913.
- 17. Hall RM, Brookes DE, Stokes HW.**
Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point.
Molecular Microbiology, 1991, 5(8), 1941-1959.
- 18. Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM.**
Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes.
Molecular Microbiology, 1997, 26(4), 731-745.
- 19. Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM.**
Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines.
Journal of Bacteriology, 2002, 184(11), 3017-3026.
- 20. Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundstrom L, Skold O, Swedberg G, Skurray RA.**
The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1993, 37(4), 761-768.
- 21. Collis CM, Hall RM.**
Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase.
Journal of Bacteriology, 1992, 174(5), 1574-1585.
- 22. Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM.**
Site-specific insertion of gene cassettes into integrons.
Molecular Microbiology, 1993, 9(1), 41-52.
- 23. Collis CM, Recchia GD, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM.**
Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1.
Journal of Bacteriology, 2001, 183(8), 2535-2542.
- 24. Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM.**
Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site.
Molecular Microbiology, 2002, 46(5), 1415-27.
- 25. Bouvier M, Demarre G, Mazel D.**
Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate.
The EMBO Journal, 2005, 24(24), 4356-4367.
- 26. MacDonald D, Demarre G, Bouvier M, Mazel D, Gopaul DN.**
Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination.
Nature, 2006, 440(7088), 1157-1162.
- 27. Ploy MC, Courvalin P, Lambert T.**
Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmIA2* and *qacF*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42(10), 2557-2563.

- 28. Collis CM, Hall RM.**
Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 39(1), 155-162.
- 29. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J.**
A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome.
Science, 1998, 280(5363), 605-608.
- 30. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D.**
Super-integrons.
Research in Microbiology, 1999, 150(9-10), 641-651.
- 31. Mazel D.**
Integrons: agents of bacterial evolution.
Nature reviews. Microbiology, 2006, 4(8), 608-620.
- 32. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D.**
The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(2), 652-657.
- 33. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D.**
Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes.
Molecular Microbiology, 2002, 43(6), 1657-1669.
- 34. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW.**
Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria.
Trends in Microbiology, 2007, 15(7), 301-309.
- 35. Leon G, Roy PH.**
Excision and integration of cassettes by an integron integrase of *Nitrosomonas europaea*.
Journal of Bacteriology, 2003, 185(6), 2036-2041.
- 36. Coleman N, Tetu S, Wilson N, Holmes A.**
An unusual integron in *Treponema denticola*.
Microbiology, 2004, 150(Pt 11), 3524-3526.
- 37. Elsaied H, Stokes HW, Nakamura T, Kitamura K, Fuse H, Maruyama A.**
Novel and diverse integron integrase genes and integron-like gene cassettes are prevalent in deep-sea hydrothermal vents.
Environmental Microbiology, 2007, 9(9), 2298-2312.
- 38. Sundstrom L, Roy PH, Skold O.**
Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon *Tn7*.
Journal of Bacteriology, 1991, 173(9), 3025-3028.
- 39. Lichtenstein C, Brenner S.**
Unique insertion site of *Tn7* in the *E. coli* chromosome.
Nature, 1982, 297(5867), 601-603.
- 40. Wolkow CA, DeBoy RT, Craig NL.**
Conjugating plasmids are preferred targets for *Tn7*.
Genes and Development, 1996, 10(17), 2145-2157.
- 41. Ramirez MS, Vargas LJ, Cagnoni V, Tokumoto M, Centron D.**
Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(10), 4418-4420.
- 42. Biskri L, Mazel D.**
Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(10), 3326-3331.

- 43. Ramirez MS, Quiroga C, Centron D.**
Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(12), 5179-5181.
- 44. Barlow RS, Gobius KS.**
Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(6), 1133-1138.
- 45. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M.**
A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 39(7), 1612-1615.
- 46. Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, Mendo S, Duarte A.**
Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(9), 2838-2843.
- 47. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y.**
PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12), 5407-5413.
- 48. Xu H, Davies J, Miao V.**
Molecular characterization of class 3 Integrons from *Delftia* spp.
Journal of Bacteriology, 2007, 189(17), 6276-6283.
- 49. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T.**
Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(10), 2684-2688.
- 50. Tsakris A, Ikonomidis A, Spanakis N, Poulou A, Pournaras S.**
Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-I metallo-beta-lactamase and *satI* gene, from *Morganella morganii*.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(4), 739-741.
- 51. Soto SM, Lobato MJ, Mendoza MC.**
Class 1 integron-borne gene cassettes in multidrug-resistant *Yersinia enterocolitica* strains of different phenotypic and genetic types.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(1), 421-426.
- 52. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P.**
Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43(3), 573-581.
- 53. Machado E, Canton R, Baquero F, Galan JC, Rollan A, Peixe L, Coque TM.**
Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(5), 1823-1829.
- 54. Sabate M, Navarro F, Miro E, Campoy S, Mirelis B, Barbe J, Prats G.**
Novel complex *sul*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*(CTX-M-9).
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46(8), 2656-2661.
- 55. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P.**
Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(3), 622-632.

- 56. Bagattini M, Crispino M, Gentile F, Barretta E, Schiavone D, Boccia MC, Triassi M, Zarrilli R.**
A nosocomial outbreak of *Serratia marcescens* producing inducible AmpC-type beta-lactamase enzyme and carrying antimicrobial resistance genes within a class 1 integron.
The Journal of Hospital Infection, 2004, 56(1), 29-36.
- 57. Jeong SH, Lee K, Chong Y, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, Kim JM, Park KH, Han BH, Lee SW, Jeong TS.**
Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 51(2), 397-400.
- 58. Ploy MC, Chainier D, Tran Thi NH, Poilane I, Cruaud P, Denis F, Collignon A, Lambert T.**
Integron-associated antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi from Asia.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(4), 1427-1429.
- 59. Rodriguez I, Rodicio MR, Mendoza MC, Cruz Martin M.**
Large conjugative plasmids from clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-associated drug resistance determinants.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(4), 1603-1607.
- 60. Casin I, Breuil J, Brisabois A, Moury F, Grimont F, Collatz E.**
Multidrug-resistant human and animal *Salmonella* Typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamase PSE-1.
The Journal of Infectious Diseases, 1999, 179(5), 1173-1182.
- 61. Gassama-Sow A, Diallo MH, Boye CS, Garin B, Sire JM, Sow AI, Aidara-Kane A.**
Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal.
International Journal of Antimicrobial Agents, 2006, 27(3), 267-270.
- 62. Oh JY, Yu HS, Kim SK, Seol SY, Cho DT, Lee JC.**
Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from southwestern Korea during epidemic periods.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(1), 421-423.
- 63. Pan JC, Ye R, Meng DM, Zhang W, Wang HQ, Liu KZ.**
Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(2), 288-296.
- 64. Naas T, Benaoudia F, Massuard S, Nordmann P.**
Integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 46(5), 703-711.
- 65. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P.**
Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla(VIM-2)* carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(2), 546-552.
- 66. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Ko WC, Wu JJ.**
Characterization of acquired beta-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(3), 530-536.
- 67. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P.**
Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(8), 3593-3597.

- 68. Seward RJ.**
Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp.
Clinical Microbiology and Infection, 1999, 5(6), 308-318.
- 69. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, Pitt TL.**
Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(7), 3074-3082.
- 70. Lee MD, Sanchez S, Zimmer M, Idris U, Berrang ME, McDermott PF.**
Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46(11), 3660-3664.
- 71. Van Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K, Mevius D.**
Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(4), 746-750.
- 72. Schmidt AS, Bruun MS, Larsen JL, Dalsgaard I.**
Characterization of class I integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 47(6), 735-743.
- 73. L'Abec-Lund TM, Sorum H.**
Class I integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide.
Microbial Drug Resistance, 2001, 7(3), 263-272.
- 74. Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, Centron D, Pineiro SA.**
Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(2), 666-669.
- 75. Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR.**
Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes.
Emerging Infectious Diseases, 2007, 13(4), 559-565.
- 76. Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo MM.**
New cluster of plasmid-located class I integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(7), 2493-2499.
- 77. Ahmed AM, Kawaguchi F, Shimamoto T.**
Class 2 integrons in *Vibrio cholerae*.
Journal of Medical Microbiology, 2006, 55(5), 643-644.
- 78. Crespo O, Catalano M, Pineiro S, Matteo M, Leanza A, Centron D.**
Tn7 distribution in *Helicobacter pylori*: a selective paradox.
International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, 25(4), 341-344.
- 79. Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S.**
Molecular basis of resistance to trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica*.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(3), 485-490.
- 80. Kadlec K, Wiegand I, Kehrenberg C, Schwarz S.**
Studies on the mechanisms of beta-lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(3), 396-402.
- 81. Ramirez MS, Vargas LJ, Cagnoni V, Tokumoto M, Centron D.**
Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(10), 4418-4420.

- 82. Martin C, Timm J, Rauzier J, Gomez-Lus R, Davies J, Gicquel B.**
Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria.
Nature, 1990, 345(6277), 739-743.
- 83. Nesvera J, Hochmannova J, Patek M.**
An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*.
FEMS Microbiology Letters, 1998, 169(2), 391-395.
- 84. Tauch A, Gotker S, Puhler A, Kalinowski J, Thierbach G.**
The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100.
Plasmid, 2002, 48(2), 117-129.
- 85. Clark NC, Olsvik O, Swenson JM, Spiegel CA, Tenover FC.**
Detection of a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43(1), 157-160.
- 86. Arduino SM, Catalano M, Orman BE, Roy PH, Centron D.**
Molecular epidemiology of *orf513*-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(12), 3945-3949.
- 87. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T.**
Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacE delta 1* in Gram-positive bacteria.
FEMS Microbiology Letters, 1998, 165(2), 295-299.
- 88. Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, Summers AO.**
Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(18), 7118-7122.
- 89. Shi L, Zheng M, Xiao Z, Asakura M, Su J, Li L, Yamasaki S.**
Unnoticed spread of class 1 integrons in Gram-positive clinical strains isolated in Guangzhou, China.
Microbiology and Immunology, 2006, 50(6), 463-467.
- 90. Rosser SJ, Young HK.**
Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999, 44(1), 11-18.
- 91. Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A.**
Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters.
Research in Microbiology, 2006, 157(10), 938-947.
- 92. Mukherjee S, Chakraborty R.**
Incidence of class 1 integrons in multiple antibiotic-resistant Gram-negative copiotrophic bacteria from the River Torsa in India.
Research in Microbiology, 2006, 157(3), 220-226.
- 93. Roe MT, Vega E, Pillai SD.**
Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments.
Emerging Infectious Diseases, 2003, 9(7), 822-826.
- 94. Stokes HW, Nesbo CL, Holley M, Bahl MI, Gillings MR, Boucher Y.**
Class 1 integrons potentially predating the association with tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community.
Journal of Bacteriology, 2006, 188(16), 5722-5730.

- 95. Petersen A, Guardabassi L, Dalsgaard A, Olsen JE.**
Class I integrons containing a *dhfr-I* trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter* spp.
FEMS Microbiology Letters, 2000, 182(1), 73-76.
- 96. Jacobs L, Chenia HY.**
Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems.
International journal of food microbiology, 2007, 114(3), 295-306.
- 97. Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL.**
Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile *Aeromonads* from a fish farming environment.
Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(12), 5675-5682.
- 98. Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuolo M, Nunes OC, Manaia CM.**
Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant.
FEMS Microbiology Ecology, 2007, 60(1), 166-176.
- 99. Gaze WH, Abdoulsam N, Hawkey PM, Wellington EM.**
Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(5), 1802-1807.
- 100. Schluter A, Szczepanowski R, Puhler A, Top EM.**
Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool.
FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(4), 449-477.
- 101. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ.**
Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(3), 723-726.
- 102. Duijkeren EV, Box AT, Schellen P, Houwers DJ, Fluit AC.**
Class I integrons in *Enterobacteriaceae* isolated from clinical infections of horses and dogs in the Netherlands.
Microbial Drug Resistance, 2005, 11(4), 383-386.
- 103. Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, Gaastra W.**
Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses.
Veterinary Microbiology, 2007, 124(3-4), 248-255.
- 104. Diaz MA, Cooper RK, Cloeckaert A, Siebeling RJ.**
Plasmid-mediated high-level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtles in Louisiana.
Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1), 306-312.
- 105. Sunde M.**
Class I integron with a group II intron detected in an *Escherichia coli* strain from a free-range reindeer.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(6), 2512-2514.
- 106. Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, Shimamoto T.**
Zoo animals as a reservoir of Gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes.
Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20), 6686-6690.
- 107. Dolejska M, Cizek A, Literak I.**
High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from black-headed gulls in the Czech Republic.
Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(1), 11-19.

108. Vali L, Hamouda A, Hoyle DV, Pearce MC, Whitaker LH, Jenkins C, Knight HI, Smith AW, Amyes SG.

Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* O26, O103 and O145 shed by two cohorts of Scottish beef cattle.

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(3), 403-410.

109. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J.

Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China.

Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8), 3483-3489.

110. Agerso Y, Sandvang D.

Class I integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas spp.* isolated from pigsties and manured soil.

Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12), 7941-7947.

111. Roe MT, Byrd JA, Smith DP, Pillai SD.

Class 1 and class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments.

Journal of Food Protection, 2003, 66(8), 1426-1431.

112. Liebana E, Clouting C, Cassar CA, Randall LP, Walker RA, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Ridley AM, Davies RH.

Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales.

Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(4), 1481-1486.

113. Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R.

Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry.

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(3), 489-492.

114. Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS.

Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(3), 838-842.

115. White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Chen S, McDermott PF, McDermott S, Wagner DD, Meng J.

The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats.

The New England Journal of Medicine, 2001, 345(16), 1147-1154.

116. Chen S, Zhao S, White DG, Schroeder CM, Lu R, Yang H, McDermott PF, Ayers S, Meng J.

Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats.

Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1), 1-7.

117. Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R.

Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany.

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(6), 1025-1033.

118. Sunde M.

Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin.

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(6), 1019-1024.

119. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L.

Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella* Typhimurium clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase.

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 54(2), 429-434.

- 120. Hoyle DV, Davison HC, Knight HI, Yates CM, Dobay O, Gunn GJ, Amyes SG, Woolhouse ME.**
Molecular characterisation of bovine faecal *Escherichia coli* shows persistence of defined ampicillin resistant strains and the presence of class I integrons on an organic beef farm.
Veterinary Microbiology, 2006, 115(1-3), 250-257.
- 121. Smith JL, Drum DJ, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL, Lee MD.**
Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens.
Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(5), 1404-1414.
- 122. Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B, Denamur E.**
Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 57(6), 1215-1219.
- 123. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD.**
Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(9), 2658-2661.
- 124. Yu HS, Lee JC, Kang HY, Ro DW, Chung JY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Lee EY, Seol SY, Lee YC, Cho DT.**
Changes in gene cassettes of class I integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12), 5429-5433.
- 125. Heir E, Lindstedt BA, Leegaard TM, Gjernes E, Kapperud G.**
Prevalence and characterization of integrons in blood culture *Enterobacteriaceae* and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class I integron-located lincosamide resistance gene.
Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2004, 3:12.
- 126. Schmitz FJ, Hafner D, Geisel R, Follmann P, Kirschke C, Verhoef J, Kohrer K, Fluit AC.**
Increased prevalence of class I integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Enterobacter* species isolates over a 7-year period in a German university hospital.
Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(10), 3724-3726.
- 127. Rao AN, Barlow M, Clark LA, Boring JR 3rd, Tenover FC, McGowan JE Jr.**
Class I integrons in resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., US hospitals.
Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(6), 1011-1014.
- 128. Solberg OD, Ajiboye RM, Riley LW.**
Origin of class I and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*.
Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(4), 1347-1351.
- 129. Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VS, Verhoef J, Jones ME.**
Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1998, 42(6), 689-696.
- 130. Leverstein-van Hall MA, M Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J.**
Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin.
The Journal of Infectious Diseases, 2003, 187(2), 251-259.
- 131. Leverstein-Van Hall MA, Paauw A, Box AT, Blok HE, Verhoef J, Fluit AC.**
Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital.
Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(8), 3038-3040.

132. Skurnik D, Le Menac'h A, Zurakowski D, Mazel D, Courvalin P, Denamur E, Andreumont A, Ruimy R.

Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(7), 3062-3065.

133. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LM.

Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction.

The Lancet, 2001, 357(9265), 1325-1328. Erratum in: *The Lancet*, 2001, 357(9271), 1890.

134. Severino P, Magalhaes VD.

Integrations as tools for epidemiological studies.

Clinical Microbiology and Infection, 2004, 10(2), 156-162.

135. Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, Jones ME.

Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43(3), 686-689.

136. Dubois V, Parizano MP, Arpin C, Coulange L, Beziau MC, Quentin C.

High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(4), 1333-1340.

137. Mullis KB, Faloona FA.

Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.

Methods in Enzymology, 1987, 155, 335-350.

138. Ameziane N, Bogard M, Lamoril J.

Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.

Campus référence. Paris : Elsevier, 2006, 705 p.

139. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.

Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.

Biotechnology, 1993, 11(9), 1026-1030.

140. Tse C, Capeau J.

Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids.

Annales de Biologie Clinique, 2003, 61(3), 279-293.

141. Poitras E, Houde A.

La PCR en temps réel : principes et applications.

Reviews in Biology and Biotechnology, 2002, 2(2), 2-11.

142. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F.

Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.

Nucleic Acids Research, 2004, 32(12), e103.

143. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT.

Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.

Analytical Biochemistry, 1997, 245(2), 154-160.

144. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K.

Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.

PCR Methods and Applications, 1995, 4(6), 357-362.

145. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempsey R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J.

3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures.

Nucleic Acids Research, 2000, 28(2), 655-661.

- 146. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP.**
Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.
Biotechniques, 1997, 22(1), 130-131, 134-138.
- 147. Tyagi S, Kramer FR.**
Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.
Nature Biotechnology, 1996, 14(3), 303-308.
- 148. Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T.**
Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection.
Nucleic Acids Research, 2000, 28(19), 3752-3761.
- 149. Kreuzer KA, Bohn A, Lupberger J, Solassol J, le Coutre P, Schmidt CA.**
Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid as a dark quencher dye.
Clinical Chemistry, 2001, 47(3), 486-490.
- 150. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF.**
Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing.
Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(1), 165-256.
- 151. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.**
Real-time PCR in virology.
Nucleic Acids Research, 2002, 30(6), 1292-1305.
- 152. Saha BK, Tian B, Bucy RP.**
Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe.
Journal of Virological Methods, 2001, 93(1-2), 33-42.
- 153. Martell M, Gomez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R, Guardia J.**
High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA.
Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(2), 327-332.
- 154. Candotti D, Temple J, Owusu-Ofori S, Allain JP.**
Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1.
Journal of Virological Methods, 2004, 118(1), 39-47.
- 155. Pradeau K, Couty L, Szelag JC, Turlure P, Rolle F, Ferrat P, Bordessoule D, Le Meur Y, Denis F, Ranger-Rogez S.**
Multiplex real-time PCR assay for simultaneous quantitation of human cytomegalovirus and herpesvirus-6 in polymorphonuclear and mononuclear cells of transplant recipients.
Journal of Virological Methods, 2006, 132(1-2), 77-84.
- 156. Fenollar F, Fournier PE, Raoult D, Gerolami R, Lepidi H, Poyart C.**
Quantitative detection of *Tropheryma whippelii* DNA by real-time PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(3), 1119-1120.
- 157. Kocagoz T, Saribas Z, Alp A.**
Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(12), 6015-6019.
- 158. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N.**
Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(6), 2429-2433.

- 159. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB.**
Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(4), 1553-1558.
- 160. Molling P, Jacobsson S, Backman A, Olcen P.**
Direct and rapid identification and genogrouping of meningococci and *porA* amplification by LightCycler PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(12), 4531-4535.
- 161. Mensink E, van de Locht A, Schattenberg A, Linders E, Schaap N, Geurts van Kessel A, De Witte T.**
Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR.
British Journal of Haematology, 1998, 102(3), 768-774.
- 162. Dillon B, Thomas L, Mohmand G, Zelynski A, Iredell J.**
Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates.
Journal of Microbiological Methods, 2005, 62(2), 221-232.
- 163. Maguire AJ, Brown DF, Gray JJ, Desselberger U.**
Rapid screening technique for class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* and nonfermenting Gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(4), 1022-1029.
- 164. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.**
Communiqué 2007. Paris : Société Française de Microbiologie, 2007, <http://www.sfm.asso.fr>
- 165. Martin C, Vincent JL.**
Sepsis sévère et choc septique.
Le point sur... Paris : Springer, 2005, 342 p.
- 166. Esposito S, Leone S.**
Antimicrobial treatment for Intensive Care Unit (ICU) infections including the role of the infectious disease specialist.
International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, 29(5), 494-500.
- 167. Daikos GL, Kosmidis C, Tassios PT, Petrikos G, Vasilakopoulou A, Psychogiou M, Stefanou I, Avlami A, Katsilambros N.**
Enterobacteriaceae bloodstream infections: presence of integrons, risk factors, and outcome.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(7), 2366-2372.
- 168. Yu HS, Lee JC, Kang HY, Jeong YS, Lee EY, Choi CH, Tae SH, Lee YC, Seol SY, Cho DT.**
Prevalence of *dfr* genes associated with integrons and dissemination of *dfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea.
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 53(3), 445-450.
- 169. Nijssen S, Florijn A, Top J, Willems R, Fluit A, Bonten M.**
Unnoticed spread of integron-carrying *Enterobacteriaceae* in intensive care units.
Clinical Infectious Diseases, 2005, 41(1), 1-9.
- 170. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D.**
Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis.
The American Journal of Medicine, 2003, 115(7), 529-535.
- 171. Leverstein-van Hall MA, Box AT, Blok HE, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J.**
Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in a clinical setting.
The Journal of Infectious Diseases, 2002, 186(1), 49-56.

Table des matières

Abréviations	9
Introduction	10
Rappels bibliographiques	12
I. Les intégrons	14
A. Généralités.....	14
1. Historique	14
2. Définition	14
3. Structure des intégrons	15
a. La région 5' conservée (<i>5' conserved segment</i>)	16
b. La région variable.....	20
c. La région 3'	23
4. Mécanistique des intégrons	24
a. Les réarrangements de cassettes.....	24
b. L'expression des gènes de cassettes	27
c. Effet de la pression de sélection antibiotique	27
5. Les superintégrons.....	28
6. Origine des intégrons	29
B. Epidémiologie des intégrons de résistance.....	30
1. Les 3 classes d'intégrons de résistance	30
a. Intégrons de classe 1 : la plus grande prévalence	30
b. Intégrons de classe 2 : la stabilité.....	31
c. Intégrons de classe 3 : la rareté.....	32
d. Intégrons chimériques	32
2. Les bactéries hôtes	33
a. Bactéries à Gram négatif	33
b. Bactéries à Gram positif.....	34
3. Place des intégrons de résistance dans l'environnement.....	34
a. Une très large répartition, de fortes prévalences	34
b. Usage des antibiotiques et environnement	37
4. Place des intégrons en microbiologie humaine	37
a. Prévalence.....	38
b. Lien entre intégrons et résistance	38
c. Effet de la pression de sélection antibiotique	39
d. Outils épidémiologiques.....	41
5. Stabilité des intégrons	41
6. La partie immergée de l'iceberg ?.....	42

II. La PCR en temps réel	43
A. Rappels sur la PCR classique, dite en point final.....	43
B. Principe de la PCR en temps réel.....	47
1. Les différentes chimies utilisées	47
a. Les agents intercalants.....	47
b. Les sondes fluorogéniques	48
2. Sondes fluorogéniques et multiplexage.....	54
3. Considérations mathématiques.....	55
a. Notion d'efficacité.....	56
b. Notion de seuil (t) et de cycle seuil (C _t).....	56
c. Equation de la droite C _t = f(Q ₀)	57
d. Quantification.....	58
C. Avantages de la PCR en temps réel	59
D. Appareils de PCR en temps réel.....	61
E. Applications de la PCR en temps réel.....	62

Introduction à l'étude expérimentale..... 63

Matériel et méthodes..... 68

III. Matériels et méthodes	69
A. Souches bactériennes et plasmides.....	69
1. Souches et plasmides témoins.....	69
2. Souches cliniques	70
B. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	71
C. Prélèvements biologiques des patients en sepsis sévère	71
D. Extraction de l'ADN	72
1. Souches bactériennes.....	72
2. Plasmides.....	72
3. Liquides biologiques	72
E. Préparation des gammes de plasmides témoins	72
F. Choix des amorces et des sondes	73
1. Critères liés aux gènes.....	73
2. Critères liés aux amorces.....	74
3. Critères liés aux sondes	74
G. Mise au point des PCR simplex	75
1. Essais de sensibilité, choix des amorces	76
2. Essais de spécificité.....	76
3. Essais de reproductibilité	76
H. Mise au point de la PCR multiplex	77
1. Essais de sensibilité et de reproductibilité.....	77
2. Essais de spécificité.....	78
I. Analyse statistique des résultats « intégrons en microbiologie clinique ».....	78

Résultats	79
IV. Résultats	80
A. Mise au point de la PCR en temps réel multiplex	80
1. Mise au point des PCR simplex	80
a. PCR simplex <i>intI1</i>	80
b. PCR simplex <i>intI2</i>	83
c. PCR simplex <i>intI3</i>	85
2. Mise au point de la PCR multiplex	87
a. Essais de sensibilité et de reproductibilité.....	87
b. Essais de spécificité.....	105
B. Intégrons en microbiologie clinique.....	106
1. Souches bactériennes isolées d'hémocultures.....	106
a. Sensibilité aux antibiotiques.....	106
b. Prévalence des intégrons	107
c. Intégrons et résistance	108
d. Intégrons et résistance acquise	109
e. Sensibilité aux antibiotiques des souches <i>intI1</i> +.....	110
2. Souches bactériennes et liquides biologiques de patients en sepsis sévère.....	111
a. Prévalence des intégrons	112
b. Intégrons et résistance	114
c. Antibiogramme des souches <i>intI1</i> +.....	115
 Discussion	 117
V. Discussion	118
 Conclusion	 126
 Bibliographie	 128

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

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

DON A IMPRIMER N° 3368

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

De la Direction de la Faculté

VO et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

RESUME

L'objectif principal de nos travaux était de mettre au point une technique capable de détecter rapidement et de façon spécifique des intégrons de résistance non seulement au sein de souches bactériennes, mais aussi au sein d'environnements génétiques plus complexes. Nos travaux ont permis de développer une technique de PCR en temps réel multiplex qui répond à ces différents critères. Sa sensibilité est de 10^2 copies pour chacun des gènes recherchés. Elle a été validée pour des gammes de concentration allant de 10^7 à 10^2 copies de chacun des gènes, avec de très bonnes reproductibilité et efficacité d'amplification. Elle s'est révélée spécifique du gène cible et n'a pas été prise en défaut à la fois en présence d'une autre intégrase, ni en présence d'extraits d'ADN de bactéries dénuées d'intégrons et d'extraits d'ADN non bactériens. Il s'agit par ailleurs d'une méthode très rapide qui permet de rendre un résultat en quelques heures.

L'application de notre technique sur des souches de bactéries à Gram négatif isolées d'hémocultures a montré une prévalence des intégrons de 16,3 %. La prévalence au sein des entérobactéries, seules espèces de l'étude hébergeant un intégron, est de 21,6 %. Ce chiffre semble légèrement supérieur aux données de la littérature, tout en sachant que notre étude a porté sur des germes isolés dans un service de soins intensifs où les patients sont soumis à une forte pression de sélection antibiotique. Un lien statistique significatif a été montré entre la présence d'intégrons et l'acquisition d'une résistance à au moins un antibiotique : l'association est très significative pour la résistance acquise aux pénicillines et au cotrimoxazole. L'application avec succès de la technique directement sur des prélèvements biologiques constitue une approche intéressante de détection précoce des résistances.

Development of a multiplex real-time PCR to detect the three classes of resistant integrons.

The objective was to develop a multiplex real-time PCR able to detect rapidly and specifically integrons from strains but also from complex genetic environments. Sensitivity was 10^2 copies for each gene, with validity between 10^2 and 10^7 copies with good reproducibility and specificity. Results can be obtained within few hours.

Application of our technique on Gram-negative strains isolated from blood cultures gave a global integron prevalence of 16.3 % and 21.6 % if we considered only *Enterobacteriaceae*. This is higher than data from other studies, but our study deals with species isolated from patients hospitalised in an intensive care unit submitted to a strong antibiotic pressure. A significant link was demonstrated between integron and acquired resistance; association is highly significant with penicillins and cotrimoxazole. The multiplex PCR was successfully applied directly on biological samples and constitutes an interesting approach of early detection of resistance.

DISCIPLINE : Pharmacie

MOTS-CLES : intégrons, PCR temps réel, antibiotique, résistance

LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-HYGIENE
EA 3175 - Equipe Avenir Inserm
CHRU Dupuytren / Faculté de Médecine
2 avenue Martin Luther King
87 042 Limoges Cedex